

SORAIA REDA GILBER

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM COMPARAÇÃO COM O
TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI) E ELISA
(ENZIMAIMUNOENSAIO) NO DIAGNÓSTICO
PARA A DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Processos Biotecnológicos, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Vanete Thomaz Soccol

CURITIBA

2007

DEDICATÓRIA

A Deus, que é a minha força,
a meu marido Norberto Gilber
e minhas filhas Raquel e Débora
que me dão coragem para continuar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus sobre todas as coisas: meu refúgio e fortaleza.

À Professora Dr^a Vanete Thomaz Soccol, pela orientação desse trabalho, dedicação, e conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo.

À amiga e colega, doutoranda Silvana Maria Alban pela imensa contribuição dada na parte de Biologia Molecular o meu muito obrigado.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, coordenador da Pós Graduação em Biotecnologia e Processos Biotecnológicos pelo empenho ao convênio firmado entre a Universidade Federal do Paraná, SESA, e TECPAR que possibilitou essa Pós Graduação para os trabalhadores dessas Instituições.

Ao Diretor do CPPI, Rubens Gusso, que iniciou as negociações para esse convênio.

Ao Diretor do Laboratório Central do Estado (LACEN) Marcelo Pilonetto pelo apoio recebido para participar dessa Pós Graduação.

À Diretora Técnica do LACEN Célia Fagundes da Cruz pela concessão dos kits diagnósticos utilizados nesse trabalho, bem como às dependências do LACEN.

Ao amigo e colega Dr. João Carlos Minozzo, pela coleta de sangue de coelhos para confecção do meio de cultura para *Trypanosoma cruzi*.

À amiga Regiane Szargiki do CPPI, pela confecção do anticoagulante do sangue de coelho e pelo armazenamento e transporte desse material ao LACEN.

À Dr^a Márcia Iurico Miyazaki, responsável pelo ambulatório de Doença de Chagas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, por ter disponibilizado este ambulatório e ajudado na seleção de pacientes para realização desse trabalho.

Aos Drs. Antonio Ulisses Gavazzoni e Elmar A. Fugmann, responsáveis pelo Serviço de Endoscopia Per Oral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilização desse serviço na seleção de pacientes com megaesôfago para coleta de sangue.

À médica residente Andréa Thomaz Soccol pela intermediação feita junto ao Serviço de endoscopia Per Oral para coleta de amostras.

Às amigas e colegas do LACEN Divandrea Martins Matioski e Maria Tadeu Lemes da Rocha, que foram grandes alicerces ajudando na separação do sangue, confecção das lâminas de IFI e no registro e transporte das amostras do Hospital de Clínicas para o LACEN.

Às bioquímicas da Seção de Imunologia Ana Maria B. Bortolotto e Luciana Cristina Fagundes Gequelin que assumiram meu lugar enquanto eu cursava as disciplinas e me apoiaram em todos os momentos.

À médica e amiga Elisa Eleonora Greco Novello que veio para assumir um serviço que me impossibilitava de participar da Pós Graduação.

À Professora Dr^a Edilene Alcântara de Castro pela grande ajuda dada neste trabalho.

À Professora Dr^a Rosângela C. Paulino pelo apoio e por trazer muitas bibliografias interessantes para o enriquecimento dessa pesquisa.

Às funcionárias e amigas Juliana Tracz Pereira e Luciane Mara Hennig pelo apoio e ajuda no laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR, onde foram realizados os experimentos de Biologia Molecular.

Aos amigos e colegas do laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR Yanê Carvalho e Nelson Luis Melo Fernandes pelo apoio e amizade.

Às colegas do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná Gisele Alves Facciolli, Sílvia Cristina Barbosa e Celina Aparecida Peixoto pela ajuda na coleta de sangue dos pacientes do Hospital de Clínicas quando o acesso venoso era muito difícil, elas foram fortes aliadas nesse momento.

À minha chefe imediata do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná Anália Maria B. Machado, por todo o apoio recebido para que eu pudesse frequentar a Pós Graduação.

Ao Dr. Giorgio Roberto Baldanzi Chefe do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná por ter concedido um horário especial durante a Pós Graduação.

À amiga Samira Chahad Ehlers, pelo apoio, amizade e ajuda em muitos momentos difíceis.

Às colegas do Setor de Biologia Molecular do LACEN Sueli Nakatani, Irina N. Riediger, Débora Bubba, Cláudia Zen, Helena L. Misugi, pelo empréstimo da sala para extração de DNA do sangue dos pacientes e pelo apoio recebido.

A todos os professores que ministraram as disciplinas na Pós Graduação e nos enriqueceram com seus conhecimentos e experiências.

Ao Dr. Rogério Luiz Kopp que cedeu uma cópia de sua tese de doutorado, também pelo apoio e pela amizade.

À minha mãe Marilene Bonato Reda que muitas vezes ficou com minhas filhas para que eu cursasse as disciplinas.

Ao Dr. Mário Steindel que cedeu cepas referências de *Trypanosoma rangeli* utilizadas nesse estudo.

Aos demais colegas do LACEN da Secretaria da Saúde do Paraná e do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas da UPFR que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Aos funcionários José Renato Milleck e Adair Maria de Auda do Serviço de Endoscopia Per-Oral pela gentileza em me receber e separar os prontuários de pacientes chagásicos, bem como aos demais funcionários dessa unidade que sempre foram muito simpáticos e receptivos.

“Sempre fui estudante e me dirijo a todos os estudantes de medicina do Brasil e do mundo: não cessarei um só dia de estudar, de pesquisar e de meditar, para corrigir com autoridade a medicina de ontem, para exercitar com eficiência a medicina de hoje, para edificar com sabedoria a medicina de amanhã.”

Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 GERAL	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 HISTÓRICO	5
3.2 O AGENTE ETIOLÓGICO	6
3.2.1 Sistemática	6
3.2.2 Morfologia de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
3.2.3 Ciclo Biológico	11
3.3 OS VETORES	14
3.4 PATOGENIA	17
3.4.1 Fase Aguda	18
3.4.2 Forma Crônica Indeterminada	20
3.4.3 Doença Cardíaca	20
3.4.4 Forma Digestiva	21
3.4.5 Formas Crônicas Nervosas	24
3.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA	24
3.6 RESERVATÓRIOS	30
3.7 TRATAMENTO	31
3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS	40
4.1.2 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> Isoladas em Culturas	41
4.2 HEMOCULTURA	43
4.3 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS	44
4.3.1 Imunofluorescência Indireta	44
4.3.2. Teste Enzimaimunoensaio (ELISA)	45
4.4 MÉTODO MOLECULAR	46
4.4.1 Extração de DNA	46
4.4.1.1 Extração de DNA de <i>T. cruzi</i> obtido em cultivo	46
4.4.1.2 Extração de DNA de <i>T. cruzi</i> em sangue dos pacientes	47
4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR	49
5 RESULTADOS	53
5.1 RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM PACIENTES CHAGÁSICOS	53
5.2 PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG PELO TESTE ELISA NOS PACIENTES CHAGÁSICOS	55
5.3 RESULTADOS DA HEMOCULTURA NOS PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS	56
5.4 RESULTADOS DOS TESTES DE PCR	57
5.4.1 Teste de Sensibilidade com os Iniciadores TCZ1/TCZ2	57

5.4.2 Resultado de Especificidade da PCR com os Iniciadores TCZ1/TCZ2	58
5.4.3 Resultado dos Iniciadores TCZ1/TCZ2 para Pesquisa de DNA de <i>T. CRUZI</i> em Sangue de Pacientes e Cepas Isoladas em Culturas	59
5.4.4 Especificidade dos Iniciadores TCZ3/TCZ4	62
5.4.5 Teste de Sensibilidade com os Iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2.....	63
5.4.6 Resultado de Especificidade com os Iniciadores Tc24-T1 e Tc24-T2.....	64
5.4.7 Resultado do Teste PCR com os Iniciadores Tc24-T1 e Tc24-T2 com as Culturas de <i>T. cruzi</i> do Trabalho	65
5.4.8 Resultado do Teste de Sensibilidade com os Iniciadores R1/R2 para <i>T. rangeli</i>	66
5.4.9 Resultado do Teste de Especificidade dos Iniciadores R1/R2	67
5.4.10 Resultados da PCR para Culturas de <i>T. cruzi</i> Isoladas de Humanos, Reservatórios e Vetores com os Iniciadores TCZ1/TCZ2, R1/R2 E Tc24-T1/Tc24-T2	68
5.4.11 Resultados das Diferentes Metodologias Usadas para o Diagnóstico de Doença de Chagas em Pacientes Selecionados em Comparação com a Epidemiologia.....	69
5.12 ESTUDO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS	73
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- ESPÉCIES DE <i>Trypanosoma</i> DA SUBFAMÍLIA STERCORARIA DO SUBGÊNERO <i>Herpetosoma</i>	7
TABELA 2	- ESPÉCIES DO SUBGÊNERO <i>Megatrypanum</i>	7
TABELA 3	- ESPÉCIES DE <i>Trypanosoma</i> DA SUBFAMÍLIA <i>Salivaria</i> DO SUBGÊNERO <i>Dutonella</i>	8
TABELA 4	- ESPÉCIES DE <i>Trypanosoma</i> DO SUBGÊNERO <i>Nannomonas</i>	8
TABELA 5	- ESPÉCIES DE <i>Trypanosoma</i> DO SUBGÊNERO <i>Pycnomonas</i>	8
TABELA 6	- ESPÉCIES DE <i>Trypanosoma</i> DO SUBGÊNERO <i>Trypanozoon</i>	8
TABELA 7	- AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM DOENÇA DE CHAGAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO PARA AVALIAÇÃO PELAS TÉCNICAS DE IMUNODIAGNÓSTICO (IFI E ELISA) E MOLECULAR (PCR)	41
TABELA 8	- CEPAS DE TRYPANOSOMATIDAE ISOLADAS DE TRIATOMÍNEOS E RESERVATÓRIOS COM SUA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E NÚMERO DE CÓDIGO	42
TABELA 9	- CEPAS DE TRYPANOSOMATIDAE ISOLADAS DE HUMANOS	43
TABELA 10	- CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i> ISOLADAS DE HUMANOS E IDENTIFICADAS PREVIAMENTE E UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE PCR.....	43
TABELA 11	- SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POR PCR.....	50
TABELA 12	- PROTOCOLO DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> USANDO O INICIADOR TCZ1/TCZ2 ..	50
TABELA 13	- PROTOCOLO DE PCR PADRONIZADO PARA O INICIADOR R1/R2 ESPECÍFICO PARA <i>Trypanosoma rangeli</i>	51
TABELA 14	- PROTOCOLO DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> COM OS INICIADORES TCZ1/TCZ2 PRIMEIRA REAÇÃO	51
TABELA 15	- PROTOCOLO DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Trypanosoma cruzi</i> COM OS INICIADORES TCZ3/TCZ4 SEGUNDA REAÇÃO.....	52
TABELA 16	- PROTOCOLO DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> USANDO OS INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2.....	52
TABELA 17	- PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG ANTI- <i>Trypanosoma cruzi</i> PELA TÉCNICA DE IFI EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS, PROCEDENTES DE DIFERENTES LOCAIS DO	

	PARANÁ.....	54
TABELA 18	- RESULTADO DA PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgM ANTI- <i>Trypanosoma cruzi</i> PELA TÉCNICA DE IFI DE PACIENTES NA FASE AGUDA DE DOENÇA DE CHAGAS	54
TABELA 19	- RESULTADO DA PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG ANTI- <i>Trypanosoma cruzi</i> PELO TESTE IMUNOENZIMÁTICO	56
TABELA 20	- RESULTADOS DAS HEMOCULTURAS REALIZADAS EM PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA DE CHAGAS.....	57
TABELA 21	- RESULTADOS DAS AMPLIFICAÇÕES DO DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> ISOLADOS EM CULTURAS UTILIZANDO OS DIVERSOS INICIADORES	69
TABELA 22	- RESULTADOS DOS PACIENTES DO SERVIÇO DE ENDOSCOPIA PER-ORAL.....	70
TABELA 23	- RESULTADOS DE SOROLOGIA, CULTURA, PCR (TCZ1/TCZ2 E R1/R2) DOS PACIENTES DO AMBULATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS (HC).....	71
TABELA 24	- RESULTADOS DE EXAMES SOROLÓGICOS, CULTURA, PCR E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES PROVENIENTES DO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS OCORRIDO EM FEVEREIRO DE 2005.....	72
TABELA 25	- RESULTADOS DE EXAMES SOROLÓGICOS, CULTURA, PCR E EPIDEMIOLÓGICOS DE PACIENTES PROVENIENTES DO INTERIOR DO ESTADO DO PARANÁ CUJAS MORADIAS FORAM ENCONTRADAS TRIATOMÍNEOS CONTAMINADOS POR <i>T.cruzi</i>	72
TABELA 26	- RESULTADO DO PACIENTE DO SERVIÇO DE GASTROENTEROLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS COM MEGACOLON.....	73
TABELA 27	- SENSIBILIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS POR PCR	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- VISUALIZAÇÃO DE IFI REAGENTE	54
FIGURA 2	- TESTE DE IFI NÃO REAGENTE	55
FIGURA 3	- TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES TCZ1/TCZ2 PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
FIGURA 4	- TESTE DE ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES TCZ1/TCZ2 PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POR PCR.....	59
FIGURA 5	- TÉCNICA DE PCR USANDO INICIADORES TCZ1/TCZ2 COM AMOSTRAS VERDADEIRAMENTE POSITIVAS	61
FIGURA 6	- PCR REALIZADOS EM PACIENTES POSITIVOS PARA DOENÇA DE CHAGAS COM INICIADORES TCZ1/TCZ2 .	61
FIGURA 7	- AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE PARA OS INICIADORES TCZ3/TCZ4.....	62
FIGURA 8	- TESTE DE NESTED-PCR	63
FIGURA 9	- TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2	64
FIGURA 10	- TESTE DE ESPECIFICIDADE PARA PCR COM INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2	65
FIGURA 11	- REAÇÃO DE PCR COM OS INICIADORES Tc24T1/Tc24-T2 EM VÁRIAS CULTURAS.....	66
FIGURA 12	- TESTE DE SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE PCR COM OS INICIADORES R1/R2	67
FIGURA 13	- TESTE DE ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES R1/R2	68

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade causada por *Trypanosoma cruzi* e que se apresenta de forma assintomática ou por manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas. Os testes sorológicos para diagnóstico são sensíveis, mas inespecíficos. A detecção direta do parasito no sangue por hemocultura é específica, mas é de baixa sensibilidade. Métodos como a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) tem sido proposta como uma alternativa para a detecção de *T. cruzi* no sangue. Visando comparar a sensibilidade dos métodos sorológicos (Imunofluorescência Indireta - IFI e Ensaio imunoenzimático - ELISA) e molecular (PCR) para confirmação da doença de Chagas em pacientes com cardiopatia, megaesôfago, megacolon, doença indeterminada e aguda foi desenvolvido este trabalho. Foram selecionados 77 pacientes para o estudo, 55 tiveram histórico epidemiológico para doença de chagas e destes 48 (87,27%) e 52 (94,54%) tiveram sorologia positiva por ELISA e IFI respectivamente. Para a técnica de PCR dois pares de iniciadores específicos para *T. cruzi* (TCZ1/TCZ2, Tc24T1/Tc24T2) e um par de iniciadores para *T. rangeli* (R1/R2) foram avaliados. Os iniciadores TCZ1/TCZ2 apresentaram sensibilidade de 96,1% e poderão ser facilmente utilizados no laboratório como diagnóstico de certeza aliados aos iniciadores R1/R2 de *T. rangeli* e à sorologia. Para os iniciadores Tc24T1/Tc24T2 observou-se amplificação de DNA de *Leishmania braziliensis* e não amplificação de DNA de *T. cruzi* em amostras sanguíneas. Nenhum paciente apresentou PCR positiva para *T. rangeli*. Para o diagnóstico laboratorial de pacientes rejeitados em bancos de sangue com sorologia positiva para doença de Chagas, a PCR se torna excelente metodologia para dar suporte aos LACENs para confirmar ou infirmar o diagnóstico. Tais pacientes normalmente não possuem clínica e a PCR seria mais um teste para auxiliar no diagnóstico.

ABSTRACT

Chagas's disease is a disease caused by *Trypanosoma cruzi* that occurs either in an asymptomatic form or with cardiac, digestive, or neurological manifestations. The serological diagnostic tests are sensitive but nonspecific. The direct detection of the parasite in blood by hemoculture is specific, but it has low sensitivity. Methods like the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been proposed as an alternative way of detecting *T. cruzi* in blood. The present work was developed aiming at comparing the sensitivity of serological methods (Indirect Immunofluorescence-IFI and Immunoenzymatic Assay-ELISA) and molecular methods (PCR) in order to confirm Chagas's disease in patients with cardiopathies, megaesophagus, megacolon, and indefinite and acute illnesses. Seventy-seven patients were selected for the study, 55 of which had an epidemiological history for Chagas's disease and 48 (87.27%) and 52 (94.54%) out of them had positive serology for ELISA and IFI, respectively. For the PCR technique, two pairs of specific primers for *T. cruzi* (TCZ1/TCZ2, Tc24T1/Tc24T2) and a pair of primers for *T. rangeli* (R1/R2) were evaluated. Primers TCZ1/TCZ2 presented 96.1% sensitivity and can easily be used in laboratory combined with serology. PCR using primers Tc24T1/Tc24T2 showed bands only in samples obtained from parasites' culture; but when applied to blood samples of patients all samples were negative. Furthermore, this primer showed amplification to *Leishmania braziliensis*'s DNA. No patient presented positive PCR for *T. rangeli*. For laboratory diagnosis of Blood Banks' rejected patients with positive serology for Chagas's disease, the PCR becomes an excellent methodology for supporting the LACENs in diagnosis confirmation or infirmation. Such patients normally do not have clinical symptoms and the PCR would be another tool that could help in the diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é um problema de Saúde Pública em toda a América Latina, sendo seu agente etiológico o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. Esta antroponose atinge atualmente 12 a 14 milhões de pessoas e, 70 a 80 milhões de indivíduos estão expostos ao risco (DIAS, 2005). É a quarta doença transmissível de maior impacto na América Latina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No Estado do Paraná, a história da doença de Chagas inicia-se com Florêncio Gomes em 1916 assinalando, pela primeira vez, o triatomíneo *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835, na localidade de Tibagi. A primeira referência sobre a doença de Chagas endêmica no Paraná, foi em 1919, quando foram identificados quatro casos agudos exibindo evidente sinal de Romaña (KOPP, 2002).

Em 1943, foi estudado o percentual de triatomíneos infectados com o protozoário e constatou um índice de 47%, alertando, neste período, para possível disseminação da doença em meio rural (SIMÕES, 1943).

Nos anos 80, através de exames sorológicos, observa-se que em torno de 4% da população rural apresentava a infecção de forma sintomática ou assintomática. Neste mesmo período a Fundação Nacional de Saúde faz extensa campanha para erradicar o *Triatoma infestans* intradomiciliar e em 1992 é registrado o último encontro deste triatomíneo no Paraná (CAMARGO, 2007).

Todavia, ainda restam muitos pacientes chagásicos crônicos que são tratados em centros de referência como o do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (KOPP, 2002). Por outro lado, é importante salientar que com frequência são assinalados portadores assintomáticos em hemobancos e estes pacientes ficam sem diagnóstico definitivo e sem um serviço de acompanhamento.

Para o diagnóstico da doença de Chagas são amplamente usados os métodos indiretos (diagnóstico sorológico por imunofluorescência indireta e enzimmunoensaio – ELISA) devido à dificuldade de isolamento do parasito. Os novos métodos de diagnóstico por biologia molecular possibilitam uma identificação mais precisa de agentes patogênicos. Assim técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) podem ser de grande importância, quer seja para

melhorar a especificidade diagnóstica, quer seja para determinar qual o grupo do parasito que circula numa determinada região. A doença de Chagas é caracterizada por uma grande variabilidade de sintomas clínicos (cardiopatia, megacolon ou megaesôfago) ou pode mostrar-se assintomática. Porém, o determinismo de evolução para uma forma clínica, ou outra, ainda não é conhecido, podendo a heterogeneidade dos genótipos do parasito estar na base desta origem.

Muitos estudos foram e estão sendo realizados com *T. cruzi* na América Latina envolvendo análises isoenzimáticas e análises moleculares (MILES *et al.*, 1977; TIBAYRENC *et al.*, 1984; GOLDENBERG *et al.*, 1984; MILES e CIBULSKIS, 1986; TIBAYRENC *et al.*, 1988; BRENIÈRE *et al.*, 1989; TIBAYRENC *et al.*, 1990; STEVENS e GODFREY, 1992; BRENIÈRE *et al.*, 1993; BRITO *et al.*, 1993; WINCKER *et al.*, 1994; STEINDEL *et al.*, 1994; JUNQUEIRA *et al.*, 1996; CARRASCO *et al.*, 1996; MONTAMAT *et al.*, 1996; MÁRQUEZ *et al.*, 1998; KOPP, 2002), e mais recentemente estudos com DNA (CARRASCO *et al.*, 1996; STEINDEL *et al.*, 1998; BRISSE *et al.*, 2000; THOMAZ-SOCCOL, 2002, BRISSE *et al.*, 2003; BARNABÉ *et al.*, 2003).

No Paraná, entre 2001 a 2002, foi estudada a diversidade genética do protozoário em reservatórios e vetores, evidenciando um ciclo silvestre ativo produzido pela linhagem I de *Trypanosoma cruzi* (MILES, 1977) ou Cluster I (TIBAYRENC, 1984; THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2002). O parasito em pacientes humanos foi isolado e caracterizado por isoenzimas a linhagem II ou Cluster II (KOPP, 2002, KOPP *et al.*, 2005).

Os métodos moleculares surgiram como alternativa de diagnóstico mais específico e no estado do Paraná, com grande número de pacientes chagásicos crônicos, questiona-se se as técnicas moleculares teriam maior contribuição diagnóstica que as sorológicas no acompanhamento destes pacientes.

Observando as diferenças existentes nos sintomas em pacientes chagásicos crônicos, bem como a falta de sintomas em muitas ocasiões; as variações quanto à localização nestes pacientes sintomáticos, fazem crer, à comunidade científica, da possível existência de diferentes cepas de *T. cruzi*. Ou seja, diferenças genéticas devem existir para que ocorram diferentes manifestações clínicas. Estas assertivas justificam o estudo mais aprofundado, envolvendo a biologia molecular de cepas de *T. cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos.

Todos os casos de diagnóstico de doença de Chagas, sempre foram feitos por sorologia, xenodiagnóstico, diagnóstico clínico em simples esfregaço de sangue. Nosso interesse é de padronizar uma técnica de PCR para aumentar a sensibilidade diagnóstica o que permitirá aos médicos fazerem tratamentos para evitar que as formas tripomastigotas façam re-invasão de tecidos e órgãos o que poderá contribuir para diminuir o efeito patogênico do protozoário.

Por outro lado saber se as cepas de *T. cruzi* transmitidas por triatomíneos ao homem e animais são as mesmas, são fatos epidemiológicos importantes a serem estudados.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a reação de cadeia da polimerase (PCR) para *Trypanosoma cruzi* como método diagnóstico para confirmação da doença de Chagas em comparação com métodos sorológicos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade da reação de PCR para *T. cruzi*.
- Determinar a especificidade da técnica de PCR para *T. cruzi*.
- Avaliar por PCR se a sorologia positiva dos pacientes se deve ao *T. cruzi* ou ao *T. rangeli* que, compete com os mesmos vetores e distribuição geográfica e desencadeia uma reação imunológica sem causar doença no homem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

A tripanossomíase americana foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1878 a 1934), infectologista mineiro que desde 1903 se dedicava à protozoologia, especialmente a malária. Em 1907 foi designado, por seu chefe Oswaldo Cruz, para combater um foco de malária no interior de Minas Gerais que estava afetando os trabalhadores na construção das estradas de ferro da região. Ele se dirige para a região e, em condições precárias, faz de um vagão sua moradia e laboratório. Já em 1908 ele descobre em macacos do tipo sagüi um tripanossomatídeo flagelado que ele denomina *Trypanosoma minasense* (DIAS, 2000).

O médico descobre vários insetos na região, de hábitos hematofágicos e, ao triturar esses insetos e examinar ao microscópio observou flagelados parecidos com aqueles encontrados nos macacos. Carlos Chagas envia alguns espécimes do inseto ao colega Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro e, após alguns dias ele observa o mesmo flagelado em ratos de laboratório e outros animais picados pelo inseto. Como Chagas era determinado e estudioso, observou que estava frente a uma espécie nova de parasita e resolveu estudar a fundo tanto o flagelado como os insetos que abrigavam esse flagelado.

Entre março e abril do ano de 1909, Carlos Chagas examina uma criança de 2 anos, febril e ao fazer o exame de gota espessa de seu sangue ao microscópio, descobre o mesmo flagelado que estava pesquisando. Nesse momento ele percebe estar diante de uma nova doença, uma zoonose que tinha ciclos distintos: uma no inseto que ele determinou como o vetor e outra no homem e animais (silvestres e domésticos). A esse novo flagelado denominou *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu chefe Oswaldo Cruz.

O pesquisador não parou por aí, mas genialmente também descobriu os reservatórios, os insetos vetores, o ciclo biológico, a patogenia da doença, seu primeiro diagnóstico (parasitológico) através da gota espessa e as formas de tratamento (DIAS, 2000).

Desde o ano de 1911, Carlos Chagas já alertava para o risco da doença se tornar endêmica e afetar milhares de pessoas, caso as autoridades não tomassem as devidas providências, mas a inveja de alguns colegas que entenderam que ele queria glória para si, atrasou as medidas de controle. Depois de sua morte em 1934, a história registra o aumento dos casos da doença principalmente por causa das transfusões sanguíneas, tornando a doença mais metropolitana devido às constantes migrações do campo para as cidades.

Chagas Filho conta que esse genial cientista foi indicado ao prêmio Nobel de medicina em 1921, mas alguns colegas da Academia de Medicina o difamaram e impediram que ele fosse laureado (CHAGAS-FILHO, 1968; DIAS, 1999, COUTINHO, 1999). Anos mais tarde descobriram a importância da nova doença e como legado ao cientista brasileiro, deram o nome da enfermidade de “Doença de Chagas”.

Carlos Chagas morre aos 56 anos de idade de insuficiência cardíaca súbita, segundo relata seu filho Evandro Chagas, ele nunca chegou atrasado no serviço e, na primeira vez que isto ocorreu foi procurá-lo, pois trabalhavam no mesmo Instituto e descobriu-o morto na cama. Para seu filho, Carlos Chagas morreu do mesmo mal que ele descobrira, mas não quis fazer os exames para diagnosticar (COUTINHO, 2002).

Já a criança Berenice, sua primeira paciente, após o tratamento, viveu até os 82 anos de idade e morreu de insuficiência cardíaca.

3.2 O AGENTE ETIOLÓGICO

3.2.1 Sistemática

Segundo Leedale e Vickerman (2000) o gênero *Trypanosoma* tem a seguinte posição sistemática:

- Reino: Protozoa
- Sub-reino: Neozoa
 - Infra-reino: Discicristata
- Filo: Euglenozoa Cavalier - Smith, 1981
- Classe: Euglenoidea Bütschli, 1884
- Ordem: KINETOPLASTEA Honigberg, 1963

- Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
- Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901
- Gênero: *Trypanosoma* Gruby, 1842
 - Sub-gênero: *Schizotrypanum* Chagas, 1909, emend. Nöller, 1981
- Espécie: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909

Os Tripanossomatídeos estão divididos nas subfamílias Stercoraria, ou seja, aqueles que se transmitem pelas fezes dos vetores, e Salivaria, os que se transmitem pela saliva dos vetores.

A subfamília Stercoraria compreende os subgêneros: *Herpetosoma*, *Megatrypanum* e *Schizotrypanum* (tabelas 1 e 2).

A subfamília Salivaria possui os subgêneros: *Dutonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* e *Pycnomonas* (tabela 3, 4, 5 e 6).

TABELA 1 – ESPÉCIES DE *Trypanosoma* DA SUBFAMÍLIA STERCORARIA DO SUBGÊNERO *Herpetosoma*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (H.) lewisi</i>	Pulga	Ratos	Não
<i>T. (H.) musculi</i>	Pulga	Ratos	Não
<i>T. (H.) rangeli</i>	Triatomíneos	Mamíferos (homem)	Não

TABELA 2 – ESPÉCIES DO SUBGÊNERO *Megatrypanum*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (M.) theileri</i>	Moscas	Gado e antílopes	Não
<i>T. (M.) melophaguim</i>	<i>M. ovinus</i>	Ovelhas	Não

Espécies de *Trypanosoma* do subgênero *Schizotrypanum*, têm como hospedeiro final o morcego e como vetores sanguessugas, moscas e triatomíneos, não sendo patogênicos. Estão espalhados pela Europa, América do Norte e Austrália e compreendem as seguintes espécies: *T. (S.) vespertilionis*, *T. (S.) dionisii*, *T. (S.) phyllostomae* e *T. cruzi. marinkellei*.

A única espécie de interesse médico do subgênero *Schizotrypanum* é o *Trypanosoma cruzi*, tendo como vetores os triatomíneos e como reservatórios gambás, roedores silvestres, tatus e outros. Os hospedeiros são o homem e mamíferos domésticos, esta espécie é patogênica provocando a doença de Chagas.

A subfamília Salivaria está localizada, na sua maioria, no continente africano, sendo que, todas as espécies dessa família são patogênicas tanto ao homem como aos animais (tabela 3). Estes tripanossomatídeos se adaptaram a vetores diferentes como moscas e pulgas, por ser raro o encontro de triatomíneos (SMYTH, 1994).

As espécies do subgênero *Trypanozoon* estão, na sua maioria, localizadas na África e algumas nas Américas, são todas patogênicas aos homens ou aos animais.

TABELA 3 – ESPÉCIES DE *Trypanosoma* DA SUBFAMÍLIA *Salivaria* DO SUBGÊNERO *Duttonella*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (D.) vivax</i>	Mosca Tsé-Tsé Tabanídeos	Gado, ovelhas, eqüinos, antílopes, cães.	Sim
<i>T.(D.) uniforme</i>	Mosca Tsé-Tsé	Antílopes, gado, ovelhas e cabras	Sim

TABELA 4 – ESPÉCIES DE *Trypanosoma* DO SUBGÊNERO *Nannomonas*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (N.) congolense</i>	Mosca Tse-Tsé	Gado, ovelhas, zebras, javalis, eqüinos	Sim
<i>T.(N.) simiae</i>	Mosca Tse-Tsé	Javalis, porcos, camelos, possíveis bovinos e eqüinos	Sim

TABELA 5 – ESPÉCIES DE *Trypanosoma* DO SUBGÊNERO *Pycnomonas*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (P.) suis</i>	Mosca Tse-Tsé	Suínos	Sim

TABELA 6 – ESPÉCIES DE *Trypanosoma* DO SUBGÊNERO *Trypanozoon*

Espécie	Vetor	Hospedeiro	Patogênico
<i>T. (T.) equiperdum</i>	Transmissão Venérea	Eqüinos (coelhos e cães como reservatórios)	Sim
<i>T. (T.) evansi</i>	Moscas Tabanídeos	Cães, bovinos e eqüinos.	Sim
<i>T. b. brucei</i>	Moscas Tsé-Tsé	Homem, animais domésticos, antílopes	Doença do Sono
<i>T. b. gambiense</i>	Moscas Tsé-Tsé	Homem, animais domésticos, antílopes	Doença do Sono
<i>T. b. rhodesiense</i>	Moscas Tsé-Tsé	Homem, animais domésticos, antílopes	Doença do Sono

Por estudos filogenéticos, envolvendo a pesquisa de DNA, descobriu-se que os tripanossomatídeos possuem o mesmo ancestral (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005). Na era Cretácea, com a separação dos continentes Africano e Americano, acredita-se que, por emissões de radiação ou por outras razões desconhecidas, os tripanossomatídeos africanos se tornaram mais virulentos (BRISSE, 1998).

Com a enorme quantidade de tripanossomatídeos na natureza, tendo todos praticamente a mesma morfologia, só podem ser diferenciados taxonomicamente com a análise e seqüenciamento de DNA. Esse estudo se faz necessário principalmente nas contaminações humanas por *Trypanosoma rangeli* que é transmitido pelos mesmos vetores do *Trypanosoma cruzi*, produzem as mesmas respostas imunológicas, mas não representa risco patogênico ao homem e nem epidemiológico (GRISARD e STEINDEL, 2002).

3.2.2 Morfologia de *Trypanosoma cruzi*

Dentro do mamífero, no sangue, o parasito se encontra na forma tripomastigota cujas dimensões são cerca de 20 micra de comprimento por cerca de 1 micron de largura e não mostra formas em divisão. Seus movimentos são contínuos graças ao seu flagelo situado ao longo de seu corpo e, cuja característica principal, é a presença do cinetoplasto ou cinetoplastídeo na extremidade posterior do corpo, que é curta e pontiaguda. Sua forma delgada se apresenta encurvada como se fosse uma letra C. Ele fica pouco tempo nessa forma para penetrar em alguma célula do sistema retículo-endotelial ou nas fibras esqueléticas musculares, nessa fase desaparece o flagelo e ele passa a se multiplicar como amastigota, constituindo, assim, aglomerados celulares e periodicamente lançando na circulação outras formas tripomastigotas para continuar seu ciclo de vida. As formas amastigotas são redondas ou ovais com tamanho de cerca 1,5 a 4 micra de diâmetro.

O *Trypanosoma cruzi*, se destaca por apresentar um flagelo ao longo do corpo e uma organela bastante singular com dupla membrana o cinetoplasto. Este é formado por um segmento de sua longa mitocôndria onde se encontra bastante DNA do tipo especial, o kDNA (REY, 2002).

O parasito possui também uma forma de transição entre o amastigota e o tripomastigota chamada de epimastigota, são formas muito móveis encontráveis basicamente no tubo digestivo do inseto vetor e em meios artificiais de cultivo, onde também se multiplicam por divisão binária. Diferem-se dos tripomastigotas por terem o cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante menos evidente (DIAS e MACEDO, 2005).

Esferomastigotas são formas de multiplicação detectadas no estômago do vetor e no vertebrado, de aspecto arredondado e flagelo livre que emerge do cinetoplasto, no pólo celular anterior (DIAS e MACEDO, 2005).

Como todo eucarionte, o *T. cruzi* dispõe de dois genomas distintos, localizados no núcleo e na mitocôndria. Como peculiaridade deste parasito, o genoma mitocondrial concentra entre 16 a 30% do DNA celular total, quando nas demais células esta proporção não ultrapassa 1% (CARLIER *et al.*, 2002, MILES, 2004).

O *T. cruzi* não constitui uma população homogênea. Já é consenso entre os pesquisadores que diferentes cepas do parasito circulam na natureza, como se fossem linhagens distintas. Eles apresentam respostas diferentes ao nível de polimorfismo, capacidade infectante, comportamentos ao nível de distintos hospedeiros (virulência, histiotropismo, curvas de parasitemia), de adaptação a distintas espécies do vetor, de capacidade de indução de resposta imune, de sensibilidade a agentes químicos, de capacidade de replicação e diferenciação (ARAÚJO e CHIARI, 1988, MACEDO *et al.*, 2001, DEVERA *et al.*, 2003, DIAS e MACEDO, 2005). A grande variabilidade biológica e genética encontrada nessa espécie pode ser explicada pelos múltiplos contatos entre os vetores e reservatórios nas áreas endêmicas, os quais propiciaram as infecções com mais de uma população do *T. cruzi*, com distintas propriedades biológicas entre si, e coexistiram dentro de um mesmo hospedeiro, sem recombinação entre eles, constituindo as cepas monoclonais ou multiclonaes (CHIARI *et al.*, 2005). As cepas desse parasito apresentam uma estrutura clonal, na qual cada clone representaria uma linhagem que se multiplicaria por divisão binária, evoluindo independentemente ao longo do tempo e permanecendo inalterado por um grande número de gerações (TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYRENC e AYALA, 1991).

Antigamente sua caracterização era feita por caracteres morfológicos e subsídios biológicos, mas hoje, com o surgimento dos métodos bioquímicos e moleculares, já se permite a caracterização do agente etiológico através de isoenzimas (perfis de proteínas através de gel-eletroforese), caracterizando o *T. cruzi* em zimodemas (MILES *et al.*, 1977, ROMANHA, 1982; CARNEIRO, *et al.*, 1990). A importância da caracterização perfeita do *T. cruzi* se reflete nos estudos bioecológicos e epidemiológicos do parasito, pois foi descoberto que é predominante a presença de cepas do tipo zimodema 2 entre os pacientes crônicos de doença de Chagas, enquanto que, nos reservatórios de ciclo silvestre e vetores predominam as cepas de zimodema tipo 1 (DIAS, 2002).

Os perfis de microssatélites também são aplicados em estudos filogenéticos, distribuindo as populações do *T. cruzi*, principalmente entre os isolados do ciclo silvestre em três grandes grupos: cepas *T. cruzi* I, cepas *T. cruzi* II e um, com menos homogeneidade, que parece corresponder ao grupo de cepas híbridas do *T. cruzi*, ou seja, relacionado com o zimodema 3 e com populações do grupo 1/2 (MACEDO, *et al.* 2004).

As diversas técnicas de caracterização bioquímica e genética demonstram que o *T. cruzi* é constituído por populações heterogêneas, contudo os marcadores relacionados com o domínio divergente do gene 24α do RNA ribossomal (r RNA) e da região intergênica do gene do minicíon, RAPD e microssatélites foram capazes de agrupar as populações do *T. cruzi* em duas linhagens altamente divergentes, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (CHIARI *et al.*, 2005). As populações de *T. cruzi* II apresentam subdivisões, porém estudos posteriores permitirão identificar e classificar os genótipos associados a essas subdivisões, bem como o significado biológico, o que poderia explicar as diferenças clínicas encontradas na doença de Chagas (BRISSE *et al.*, 2000).

3.2.3 Ciclo Biológico

Os triatomíneos que possuem hábitos hematofágicos, ingerem formas tripomastigotas do parasito em seu repasto em mamíferos infectados. No estômago destes insetos já começam as primeiras modificações e multiplicação e se diferenciam à medida que caminham até a porção terminal do intestino. Nesta

porção terminal encontram-se as formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas quando um novo repasto se processa. Na eliminação as fezes do vetor se misturam com a urina e ambas contém os flagelados infectantes (MILES, 1999).

O *T. cruzi* é inócuo ao inseto, fruto de uma relação de milhões de anos onde ambas as espécies se encontram em equilíbrio na natureza (DIAS e MACEDO, 2005). Parece haver uma diferenciação de cepas ou tipos do flagelado de acordo com a espécie do vetor contaminado.

O ciclo completo do *T. cruzi* no inseto é de cerca de 3 a 4 semanas, podendo ser abreviado de acordo com a quantidade de protozoários ingeridos pelo inseto (BRENER, 1997).

Unicamente os animais mamíferos de pequeno e médio porte, e o homem são hospedeiros vertebrados do *T. cruzi*, no entanto o vetor é muito eclético na alimentação, sendo possível vê-lo se alimentar de aves, anfíbios e répteis, que são refratários ao *T. cruzi* (DIAS e MACEDO, 2005).

Os parasitos lançados das dejeções do inseto, e, pelo ato de coçar do indivíduo picado pelo inseto, os tripomastigotas metacíclicos invadem o organismo através do local da picada e rapidamente encontram os vasos sanguíneos. O parasito necessita invadir uma célula para fins de cumprir seu ciclo vital. Aqueles flagelados que não conseguem invadir uma célula rapidamente morrem. A entrada nas células é feita por fagocitose mediada por receptores da membrana plasmática da célula hospedeira, fenômeno complexo que pressupõe etapas de adesão e reconhecimento (BRENER, 1997),

Após a penetração da célula pelos tripomastigotas, eles perderão seu flagelo e se transformarão em amastigotas, que darão início a um processo de divisão que ocorre a cada 12 horas (DIAS e MACEDO, 2005). Uma vez saturada a célula, inicia-se a diferenciação dos amastigotas em tripomastigotas, sendo estas as únicas formas viáveis quando a célula se rompe. Estas formas reiniciarão o ciclo invadindo outras células e se multiplicando em grande quantidade.

Na fase aguda da doença é possível visualizar formas tripomastigotas no sangue dos mamíferos contaminados com muita facilidade pela grande profusão, já não sendo isto possível na forma crônica. Quando o hospedeiro vertebrado começar a responder com anticorpos haverá um equilíbrio de forças entre o parasito e o

vertebrado, caracterizando a fase crônica da doença. O vetor ao picar novamente um mamífero infectado, se contaminará continuando o ciclo biológico do parasito.

Diferentes espécies de mamíferos respondem diferentemente à contaminação pelo *T. cruzi*, havendo animais que apresentam uma reação muito amena e rápida e eliminando completamente o parasito (BRENER, 1997), mas é interessante o trabalho de Deane, 1984 que observou em espécies de *Didelphis* sp. um ciclo muito similar ao encontrado no triatomíneo, com a presença de tripomastigotas, epimastigotas e esferomastigotas no interior das glândulas odoríferas desses animais. Quando o produto dessas glândulas é lançado para proteção, possibilita a transmissão do parasito (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No invertebrado, as formas tripomastigotas ingeridas pelo vetor em seu repasto começam a se transformar formando-se esferomastigotas e epimastigotas. Estes ficam mais abundantes nas porções iniciais do intestino, onde sua replicação é extremamente ativa. A tendência é que permaneça uma população de epimastigotas ao longo do intestino médio, durante a vida do inseto infectado, sempre em multiplicação, mas também com indivíduos aderidos à mucosa do tubo, numa relação ainda não muito bem conhecida, enquanto outros se movem para o intestino terminal e para os tubos de Malpighi, onde ocorre a diferenciação para tripomastigotas (BRENER, 1997, MILES, 1999).

Diferentemente de outros tripanossomatídeos, o *T. cruzi* parece ser totalmente inócuo ao invertebrado (CARLIER, 2002). O ciclo completo do *T. cruzi* no inseto tarda, em geral, entre duas e quatro semanas (DIAS e MACEDO, 2005). Na natureza, com certa frequência, a ingestão de insetos infectados por alguns mamíferos insetívoros (primatas, marsupiais) enseja um tipo de transmissão oral para o vertebrado (DIAS e MACEDO, 2005).

A maior propagação na transmissão da doença de Chagas humana continua sendo a vetorial (do triatomíneo para o homem), em torno de 80%, a transfusional na América Latina como um todo representa um risco de 16%, a congênita (mãe-filho), 2% e outras como a via oral o risco é menor que 1%, mas também é importante (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

O mecanismo congênito representa cerca de 2% de contaminação por *T. cruzi*. A literatura também registra o risco de transmissão durante o aleitamento

materno de mães chagásicas para seus filhos, porém os casos são tão escassos que o benefício do aleitamento sobrepuja o risco de índice de infecção o que não justificaria a indicação de interrupção do aleitamento materno por mães com doença de Chagas (RASSI *et al.*, 2004).

3.3 OS VETORES

Os Triatomíneos são insetos da família Reduviidae, que através dos anos vêm sendo classificados por suas formas morfológicas (BRISSE, 1998; REY, 2002), porém a biologia molecular vem dando muitos passos para compreender sua variabilidade genética. Distinguem-se de outros reduvídeos por seu hematofagismo e por apresentarem uma probóscide retilínea, com três segmentos que fica dobrada ventralmente, quando em repouso. Os adultos medem de 1 a 6 centímetros de comprimento, tem a cabeça em geral alongada, provida de um par de antenas com 4 artículos, inseridas lateralmente em tubérculos anteníferos (REY, 2002). Atualmente estão distribuídos em 15 gêneros, 5 tribos e 122 espécies, das quais 111 são encontrados nas Américas (LENT e WYGODZINSKY, 1979; CARCAVALLO, 1997; KOPP, 2002). Muitas espécies participam da transmissão da tripanossomíase americana, causada pelo *Trypanosoma* (S.) *cruzi*. Porém, três gêneros (*Triatoma* LAPORTE, 1832, *Panstrongylus*, BERG, 1879 e *Rhodnius*, STAL, 1859) possuem maior importância epidemiológica.

Nos domicílios, a espécie mais importante é *Triatoma infestans*, Klug, 1834. Outras predominam nos focos epizooticos silvestres e peridomésticos, principalmente: *Triatoma braziliensis*, Neiva, 1911, *Triatoma sordida*, Stal, 1859 *Triatoma pseudomaculata*, Corrêa e Espínola, 1964 e *Triatoma dimidiata*, Latreille, 1811 (REY, 2002). *Triatoma infestans*, Klug, 1834, é um inseto silvestre originário dos Andes bolivianos, que se adaptou ao ambiente das casas com paredes de barro e assim, passou a conviver com a população urbana. Ele dispersou-se para onde as condições microclimáticas das habitações humanas fossem parecidas com os habitats primitivos, frescos e áridos (REY, 2002). Seu habitat passou a ser o peridomicílio (em currais, galinheiros, pombais), e nas paredes, telhados de palha, atrás de objetos onde possam esconder-se de dia. Saem à noite para se alimentar picando as pessoas. Raramente são encontrados em ambientes silvestres, assim

sendo, seu controle com inseticidas, tem sido um êxito, pois são organismos exóticos e recém adaptados ao novo meio (REY, 2002).

No Brasil, desde a década de 70, o governo tem se empenhado na erradicação do *Triatoma infestans* através de pulverizações de inseticidas nos domicílios onde eles forem endêmicos. À medida que os estados brasileiros forem erradicando esse vetor, vão recebendo o certificado de erradicação de triatomíneos (PET). É um programa desenvolvido juntamente com outros países da América do Sul como o Peru, Bolívia, Argentina, Uruguai e Paraguai (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992; SCHUMUNIS, 1997).

É importante salientar que o programa acima citado, envolve só a erradicação do *Triatoma infestans*, porém os outros gêneros de importância epidemiológica continuam perpetuando o ciclo do parasito.

O gênero *Panstrongylus*, Berg, 1879, tem duas espécies *Panstrongylus megistus*, Burmeister, 1835 e *Panstrongylus geniculatus*, Latreille, 1811 de importância na transmissão de *T. cruzi*.

Panstrongylus megistus, Burmeister, 1835 é espécie estritamente silvestre, no sul do Brasil, vivendo na mata Atlântica, em ninhos de roedores e de marsupiais. Em São Paulo, eles têm hábitos silvestres e peridomésticos, colonizando em galinheiros, por exemplo. Os insetos adultos invadem por vezes as casas, atraídos à noite pela luz. Em Minas Gerais e na Bahia, particularmente na cidade de Salvador, *P. megistus* cria-se nas casas, em plena zona urbana (REY, 2002).

A espécie *Panstrongylus geniculatus*, Latreille, 1811 é encontrada em tocas de tatus, onde se encontra infectado em fortes proporções por *T. cruzi*. Por esta razão eles têm grande importância na manutenção da zoonose em seus reservatórios naturais. O mesmo sucede com outras espécies de triatomíneos que vivem em ninhos de marsupiais, de ratos do mato e de aves.

O gênero *Rhodnius*, Stal, 1859 vive em casas com cobertura de palha, sendo na Venezuela e norte da América do Sul, o principal vetor da doença de Chagas. A espécie mais importante é o *Rhodnius prolixus*, Stal, 1859, pois essa espécie se desenvolve tanto no domicílio quanto no peridomicílio e também em ecótopos naturais como ninhos de aves, tatus, pacas e ouriços (DIAS e COURA, 1997; SILVEIRA, 2000; CARLIER *et al.*, 2002; REY, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; DIAS e MACEDO, 2005).

As espécies encontradas nos países da América Latina e potencialmente importantes na transmissão de doença de Chagas humana são:

- *Triatoma infestans*, Klug, 1834: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e sul do Peru.
- *Rhodnius prolixus*, STAL, 1859, *Triatoma tibiamaculata*, Pinto, 1926, *Triatoma dimidiata*, Latreille, 1811: Colômbia, Equador, Venezuela e norte do Peru.
- *Rhodnius prolixus*, Stal, 1859 e *Triatoma tibiamaculata*, Pinto, 1926: Guianas e Suriname.
- *Rhodnius prolixus*, Stal, 1859 *Triatoma dimidiata*, Latreille, 1811 e *Rhodnius pallescens*, Barber, 1932: América Central.
- *Triatoma mexicana*, Schaeffer, 1848, *Triatoma dimidiata*, Latreille, 1811 e *Triatoma phillosoma*, Burmeister, 1835: México.

No Brasil, as espécies mais encontradas de interesse médico incriminadas na transmissão do parasito são:

- *Triatoma infestans*, Klug, 1834, *Triatoma sordida*, Stal, 1859 *Triatoma tibiamaculata*, Pinto, 1926, *Panstrongylus megistus*, Burmeister, 1835, *Triatoma braziliensis*, Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata*, Corrêa e Espínola, 1964, *Rhodnius robustus*, Larrousse, 1927, *Panstrongylus geniculatus*, Latreille, 1811, *Panstrongylus rufotuberculatus*, Champion, 1773 (KOPP, 2002).

Programas destinados ao controle da doença de Chagas vêm apresentando bons resultados. Estudos moleculares têm auxiliado na caracterização e identificação de vetores para se conhecer a espécie a ser combatida (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005). Porém vetores nativos estão continuamente re-infestando habitações previamente tratadas com inseticidas e triatomíneos silvestres estão mantendo ciclos de transmissão da doença em regiões de floresta tropical úmida (incluindo a Amazônia), sem colonizar habitações humanas (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Sabe-se que, no Brasil, do ano de 2000 até nossos dias, já houve 202 focos de micro epidemias em famílias da bacia Amazônica, provocada por triatomíneos silvestres que não estão alojados nos domicílios. Porém, são atraídos à noite pela luz das moradias e tem provocado surtos de doença aguda pela via oral, ao contaminar alimentos expostos durante a noite, tais como o suco de açaí, ou o de

cupuaçu e até mesmo alimentos à base de cana de açúcar (Ministério da Saúde, 2006).

Nessas situações, estudos detalhados dos vetores e sua taxonomia e eco-epidemiologia são essenciais no esclarecimento das espécies mais envolvidas na transmissão da doença de Chagas humana (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

3.4 PATOGENIA

A relação parasita-hospedeiro tende sempre ao equilíbrio, de modo que, quanto mais velha for a inter-relação entre as espécies mais estabilidade haverá nessa relação. Desta maneira, os vetores invertebrados e os reservatórios da doença de Chagas não apresentam lesões ou danos. Porém, no homem a doença é relativamente recente e torna-se danosa em suas conseqüências (DIAS, 1999). As principais complicações da doença de Chagas Humana (DCH) estão localizadas em dois locais distintos: o músculo cardíaco e o sistema digestório. Todavia a patologia pode ser relacionada de acordo com o estágio da doença que o paciente se encontra. As lesões estão divididas em três tópicos principais (DIAS, 1999):

a) resposta inflamatória – o parasito logo no início invade células como os fibroblastos e macrófagos permanecendo por aproximadamente cinco dias. Nesse estágio o parasito está em processo de multiplicação onde vai romper as células ocasionando um processo degenerativo e proliferativo. A seguir penetrará em outras células e aquelas que foram rompidas serão lançadas no interstício onde haverá restos celulares e parasitos mortos que são altamente imunogênicos provocando resposta inflamatória focal. Com a repetição do processo essa reação se tornará mais forte em intensidade (DIAS, 2002).

b) Lesões celulares – elas ocorrem em diferentes fases, desde alterações mínimas e reversíveis até a necrose, devido à ação direta do parasito ou a outros mecanismos, como a ação citotóxica de células CD8+ e a ação direta de células CD4+, podendo estar parasitadas ou não. No homem as lesões celulares de maior impacto são as miocélulas cardíacas e em neurônios. Ao nível neuronal as lesões ocorrem durante todo o processo da doença, mas é mais intenso na fase aguda (DIAS, 2002).

c) Fibrose – é uma neoformação colágena, pobremente vascularizada e que tem enorme dificuldade de regressão. Chega a formar um arcabouço interno que restringe a função hemodinâmica do músculo cardíaco e precipita a insuficiência cardíaca (DIAS, 2002).

As manifestações da DCH podem ser divididas em fase aguda e crônica com sintomas clássicos ou quase imperceptíveis dependendo da cepa do *T. cruzi* e da resposta imune do hospedeiro, segundo Aluizio Prata (1997).

3.4.1 Fase Aguda

As formas tripomastigotas metacíclicas invadem células do sistema fagocítico. Uma vez dentro delas permanecem até sete dias se multiplicando intensamente até romperem as células. Multiplicar-se-ão por todo o organismo até chegarem ao miocárdio. Surge miocardite difusa com importantes lesões nas miocélulas e no sistema de condução. Ao raio X se observa cardiomegalia com coração flácido e congesto. No aparelho digestório há o ataque aos plexos nervosos intramurais das vísceras ocas, com acentuada lesão neuronal autônoma ao nível do sistema parassimpático. No Sistema Nervoso Central (SNC) também há lesão neuronal e invasão das meninges gerando uma meningoencefalite multifocal afetados durante a fase aguda, mas com baixa repercussão clínica (DIAS, 1999).

Estudos recentes demonstram que o *T. cruzi* quando infecta crianças de baixa idade, determina doença grave, podendo acarretar a morte por ataque agudo ao coração e ao SNC. É por isso que na primeira infância o prognóstico da DCH é mais grave sendo frequentemente mortal. Nos adolescentes, a doença ainda que determine casos mortais, é, na maioria das vezes, aparentemente vencida, mas passa para o estado crônico e determina o *T. cruzi* em grande porcentagem de pacientes, numerosas cardiopatias concorrendo para diminuir a vida dos pacientes (PESSOA, 1987).

Nos adultos, a doença, ainda que raramente mortal e pode induzir formas agudas aparentemente graves, devido às altas temperaturas e longos períodos febris, tem tendência a não evoluir para o estado crônico e a maioria dos enfermos parece curar-se clinicamente sem mostrar seqüelas orgânicas (AMATO-NETO *et al.*, 1997).

A lesão inicial que nem sempre é observada na prática é a que se instala no olho, chamada de sinal de Romaña, o qual se caracteriza por conjuntivite e de edema bipalpebral, geralmente unilateral, que impede a abertura do olho correspondente. A inflamação propaga-se por via linfática, aos gânglios pré e retroauriculares, submaxilares ou cervicais. Essa adenite satélite contribui para formar um complexo oftalmoganglionar muito sugestivo para o diagnóstico agudo. Propagações pelas vias congênita, oral ou transfusional, como ainda pelo leite materno e por transplante de órgão, não geram esse sinal, ausente também nos acidentes laboratoriais sem inoculação por agulha (AMATO-NETO *et al.*, 1997).

Quando a inoculação não se dá pelo olho, pode haver uma tumoração no local da picada conhecida como chagoma de inoculação, cujas lesões regredem espontaneamente, ao fim de duas semanas (PESSOA, 1987).

A parasitemia sanguínea torna-se aparente entre o 4º e o 40º dia, geralmente entre o 8º e o 12º dia e dura cerca de um mês. No hemograma pode aparecer ligeira leucocitose e linfocitose, mas há tendência à leucopenia (AMATO-NETO *et al.*, 1997).

No início, a tripanossomíase americana pode apresentar uma sintomatologia nula ou tão fugaz que passa inteiramente despercebida. Na maioria das vezes, a fase aguda é pouco sintomática, decorrendo com febre sem característica própria e apresentando uma reduzida resposta celular a antígenos de *T. cruzi* (teste intradérmico). Corresponde ao período em que os tripanossomos são facilmente encontrados no sangue, essa fase caracteriza-se clinicamente por febre, sensação de fraqueza, poliadenite, aumento do fígado e do baço. A febre no início da doença é pouco elevada, outras vezes chega a 39 ou 40°C, para manter-se depois abaixo de 38°C. Ela pode ser do tipo contínuo, remitente ou irregular, e acompanhar-se de outros sintomas gerais como astenia, cefaléia, dores pelo corpo e anorexia. O período febril dura 30 a 45 dias (REY, 2002).

A evolução e o prognóstico usualmente são benignos. Vai-se processando remissão gradativa das anormalidades percebidas clinicamente, que se completa entre 30 a 90 dias após a instalação do quadro. A presença do parasito desencadeia pronta e intensa reação inflamatória, e a formação de anticorpos específicos, a partir da 1ª semana do período de estado, influi no declínio da parasitemia (AMATO-NETO *et al.*, 1997).

3.4.2 Forma Crônica Indeterminada

Depois da fase aguda, que pode ser aparente ou inaparente, há um longo período em que os indivíduos infectados não apresentam manifestações e são considerados como estando na forma indeterminada. O estudo evolutivo a partir da fase aguda realizado por Dias (1982) em Bambuí mostrou que, após 30 anos, 40% dos chagásicos ainda permaneceram nessa fase de latência.

São desconhecidos os mecanismos que tornam o paciente a vida toda nessa fase, ou, naqueles que, depois de muito tempo indeterminados evoluem para as formas clássicas da doença (MACEDO, 1997).

Macedo (1973), no estudo longitudinal que fez na cidade de São Felipe, mostrou que 2% dos chagásicos saem a cada ano da forma indeterminada para uma forma clínica, seja cardíaca ou digestiva. Prata (1968) acredita que venha a diminuir o número de chagásicos na forma indeterminada à medida que os submetemos a métodos diagnósticos mais sensíveis para detectar as alterações iniciais da doença de Chagas. Porém, ainda, não se sabe como diagnosticar essas alterações com exatidão.

Normalmente esta fase caracteriza-se por apresentar sorologia reagente e/ou xenodiagnóstico positivo na ausência de manifestações clínicas, cardíacas, digestivas ou nervosas, assim como inexistência de alterações eletrocardiográficas e radiológicas do coração e do tubo digestivo. De modo geral o prognóstico da forma indeterminada da DCH é bom, a curto e a médio prazo (MACEDO, 1997).

Os pacientes mais idosos, classificados na forma indeterminada, apresentam menor potencial evolutivo, sendo que muitos deles poderão permanecer por toda a vida nesta forma clínica, como acreditava Prata (1990) e como demonstrados pela prevalência de indivíduos acima de 60 anos na forma indeterminada. (MACEDO, 1992).

3.4.3 Doença Cardíaca

A cardiopatia chagásica manifesta-se sob três síndromes principais: arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo. As mais frequentes são as arritmias (RASSI *et al.*, 1992).

Os pacientes com arritmias queixam-se de palpitações, sensação de parada do coração e vertigens. Nos casos de bloqueio atrioventricular, há bradicardia acentuada, com crises vertiginosas e, por vezes, ataques convulsivos decorrentes da má circulação cerebral. Outra característica é o aumento do coração. Quanto maior se apresenta o órgão pelo exame radiológico, pior é o prognóstico (RASSI *et al.*, 1997; GUIMARÃES, 1997).

Nos casos mais graves, a insuficiência cardíaca descompensada acompanha-se dos mesmos sintomas que aparecem nas cardiopatias de outras etiologias (edemas, derrames cavitários, congestão visceral, dispnéias). Entre as complicações mais graves nesta fase estão as trombozes e as embolias por destacamentos de trombos parietais, que são levados a outros órgãos (REY, 2002). As principais lesões são ao nível do miocárdio, com importante destruição de miocélulas e do sistema excito-condutor (His-Purkinje), o que origina as síndromes básicas, respectivamente, de insuficiência cardíaca e arritmias. Também ocorrem lesões significativas ao nível do sistema nervoso autônomo (destruição neuronal predominantemente parassimpática), mas, diferentemente do tubo digestivo, no coração estas alterações não constituem nem o principal nem o único mecanismo fisiopatogenético (DIAS, 2002).

A cardiopatia chagásica tende a se agravar progressivamente à medida que se exacerba a fibrose pela persistente inflamação e destruição celular. Instala-se então a hipertrofia que faz progredir para a insuficiência cardíaca favorecendo o aparecimento de aneurismas do músculo cardíaco (aneurisma de ponta) (RASSI *et al.*, 1997).

Em sua fase final o coração se apresenta como uma cardiomegalia global máxima, geralmente com a presença de aneurismas de ponta desencadeando perda de funções e alterações importantes da microcirculação das coronárias. O paciente pode ter morte súbita pela total falência do órgão (GUIMARÃES, 1997).

3.4.4 Forma Digestiva

As alterações que ocorrem no trato digestivo na doença de Chagas resultam principalmente do comprometimento do sistema nervoso entérico, em particular do plexo mesentérico de Auerbach. As células nervosas desse plexo sofrem fenômenos

degenerativos em meio ao processo inflamatório encontrado em suas vizinhanças, e seu número se reduz acentuadamente (KOEBERLE, 1961; ANDRADE e ANDRADE, 1966; TAFURI e BRENER, 1967, CREMA, 2003).

A desernevação ocorre de maneira irregular e em intensidade variável, em função de fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro, ainda não completamente esclarecidos. Como resultado da desernevação intrínseca verifica-se no esôfago e o colo distal, incoordenação motora, acalasia esfíncteriana, retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto e colo sigmóide, hipertrofia muscular e, finalmente, dilatação, levando à formação do megaesôfago e do megacolon, que caracterizam a forma digestiva da Doença de Chagas (REZENDE, 1997).

A desernevação intrínseca do esôfago que ocorre na DCH nem sempre é possível diferenciar da acalasia idiopática de caráter universal que também tem lesões degenerativas do plexo mesentérico de Auerbach, de causa desconhecida.

O megaesôfago causa distúrbio motor e se apresenta em diversos estádios evolutivos. A manifestação clínica inicial quase sempre é representada por disfagia, podendo associar-se a dor epigástrica ou retroesternal, regurgitação, soluço, ptialismo e hipertrofia das glândulas salivares, notadamente das parótidas. Tosse e sufocação noturna podem estar presentes por bronco-aspiração de alimentos regurgitados.

Rezende e colaboradores (1959) classificaram o estadiamento da doença que até hoje é utilizado em:

- Grupo I: esôfago de calibre aparentemente normal. Trânsito lento. Pequena retenção de contraste.
- Grupo II: esôfago com pequeno a moderado aumento de calibre. Apreciável retenção de contraste. Presença freqüente de ondas terciárias associadas ou não à hipertonia do esôfago inferior.
- Grupo III: esôfago com grande aumento de diâmetro, atividade motora reduzida. Hipertonia do esôfago inferior. Grande retenção de contraste.
- Grupo IV: esôfago com grande capacidade de retenção, atônico, alongado, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática.

Outra classificação utilizada para determinar o grau do megaesôfago é o de Ferreira-Santos, definida pelo diâmetro transversal da imagem do esôfago

contrastado em incidência antero-posterior, e pelo tempo de estase (VAZ, 1995; CREMA *et al.*, 2003).

Segundo vários estudos a prevalência da esofagopatia em populações chagásicas no Brasil realizada por diversos autores foi isoladamente de 8,7% por Macedo em São Felipe-BA em 1973, 8,8% por Dias *et al.* Em Bambuí-MG em 1982, Pereira encontrou 11% em V. Lapa-MG no ano de 1983, Souza *et al.* encontraram prevalência de 10,6% na cidade de Uberaba-MG em 1984. Cunha *et al.* encontraram em 1987 8,5% na cidade de Santa Maria-RS, Castro *et al.* em Mambuí-GO encontraram 7,1% de prevalência no ano de 1988. No Brasil como um todo tem-se uma prevalência média de 8,4% (DIAS, 1997).

O megacolon pode ser encontrado como visceromegalia isolada ou, o que é mais comum, em associação com o megaesôfago.

De modo geral, os pacientes buscam tratamento para o megacolon tardiamente em virtude de a constipação intestinal ser bem tolerada (REZENDE, 1997).

Não há estudos precisos sobre a prevalência de megacolon, mas sabe-se que é ligeiramente superior ao megaesôfago (KOEBERLE, 1968; LOPES *et al.*, 1989).

Muitos pacientes só procuram tratamento quando surgem complicações como fecaloma e volvo. Os sintomas mais freqüentes são: constipação intestinal, meteorismo e disquezia. A constipação é lenta e gradativa levando o paciente a fazer uso de laxantes. Além disso, os pacientes se queixam de distensão abdominal, e de um tipo especial de disquezia, que consiste na dificuldade de expulsão do bolo fecal mesmo quando as fezes são de consistência normal.

As principais complicações do megacolon são o fecaloma, a impactação fecal e o volvo do sigmóide (torção da alça sigmóide) (SILVA, 1997).

O tratamento nestes casos obedece à seguinte ordem: uso de laxativos e soluções emolientes para promover a saída do bolo fecal, lavagens intestinais e, para os demais casos, tratamento endoscópico ou cirúrgico (SILVA, 1997).

3.4.5 Formas Crônicas Nervosas

Além do comprometimento do sistema nervoso autônomo (SNA), há também comprometimento dos sistemas motor periférico e central, este último sendo muito afetado em alguns pacientes de fase aguda e também em imunodeprimidos (SICA, 1994; KÖBERLE, 1961; SIQUEIRA-BATISTA, 1996; ANDRADE, 2000; DIAS e MACEDO, 2005). Periféricamente relatam-se perdas e/ou degenerações de unidades nervosas motoras em vários músculos e mesmo nos gânglios da raiz posterior da medula, acompanhadas de hipertrofia muscular e infiltrados e áreas de desmielinização nos nervos correspondentes (SICA, 1994). No SNC de pacientes sem imunodepressão podem-se detectar lesões inflamatórias circunscritas e necrotizantes na massa cinzenta, assim como lesões hipotalâmicas ou seqüelas ocorridas na fase aguda da infecção (LOPES e CHAPADEIRO, 2004). Porém, nos pacientes imunodeprimidos ocorrem formas pseudotumorais, lesões trombóticas arteriolares e meningoencefalite aguda, com muitos parasitos detectáveis no líquido e nas lesões tissulares (SIQUEIRA-BATISTA, 1996; ROCHA *et al.*, 2000; LOPES e CHAPADEIRO, 2004; DIAS e MACEDO, 2005).

3.5 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

A Tripanossomíase americana se estende desde o centro-oeste do México até o sul da Argentina e Chile. Em qualquer lugar em que as condições sócio-climáticas favoreçam a presença do vetor triatomíneo com as habitações pobres e a condição de miséria humana. Infelizmente continua sendo um grave problema de saúde pública, uma vez que, poucos governos latino-americanos têm feito por sua população no sentido de distribuição de renda e melhoria das habitações. Mais que um problema de saúde pública, isso se constitui um problema social e de vontade política (PESSOA, 1987).

Em importantes estudos de inquéritos epidemiológicos através de exames de soroprevalência entre os anos de 1975 -1985, diferentes países da América Latina mostraram taxas que variam de 343/100.000 habitantes no Equador até 22.226/100.000 habitantes na Bolívia (DIAS, 1987; MAURICE, 1987; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1992; PAN AMERICAN

HEALTH ORGANIZATION, 1990; SEGURA, 1994). Pode-se dizer que a doença de Chagas humana se encontra em diferentes estágios de progressão, segundo o país ou a região. Em países como Argentina, Brasil, Uruguai, Chile e Venezuela há uma forte tendência de queda da incidência, pois estes países possuem medidas de controle do sangue fornecido pelos Bancos de sangue, obrigando seus responsáveis em proceder a sorologia para a Tripanossomíase americana, descartando as bolsas positivas ou indeterminadas (SCHUMUNIS, 1997; SALLES *et al.*, 2003). Estes países também empregam medidas de controle contra o vetor, borrifando com inseticidas os domicílios infestados por triatomíneos.

Em países como Bolívia, Paraguai e Peru, há grande incidência da endemia, as ações de controle estão apenas começando (DIAS e MACEDO, 2005).

Na Colômbia, América Central e México não existem programas regulares de controle contra a doença de Chagas humana, nem estudos sobre o peso médico - social que a doença provoca naqueles países (CARLIER, *et al.*, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Mas é sabido que a prevalência nessas regiões é alta.

Hoje, estima-se que 12 a 14 milhões de pessoas se acham infectadas pelo *T. cruzi*, em 18 países latino-americanos, com cerca de 70 a 80 milhões ainda expostos ao risco de infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Atualmente Uruguai e Chile e 10 dos 12 Estados endêmicos do Brasil são considerados livres da transmissão vetorial intradomiciliar da doença.

No Brasil, admite-se que existam cerca de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* e que cerca de 60 % deles estejam vivendo nos espaços urbanos, assim como em outros países (DIAS, 2005).

O custo social dessa doença é muito alto segundo estudos de Dias e Coura, 1997 e a WHO, 2002, estimando-se em 750 mil dias de vida por ano nos 7 países americanos do Cone Sul, correspondendo a U\$ 1.208 milhão/ano. O absenteísmo no trabalho somente no Brasil significa algo como U\$ 5.625.000/ano (CARLIER *et al.*, 2002).

A incidência estimada nos países que carecem de programas continuados de controle vetorial varia de 5.000 casos anuais na Nicarágua a 146.000 no México (HAYES e SCHOFIELD, 1990).

No Brasil a prevalência da doença de Chagas não é uniforme em sua distribuição geográfica, sendo 4,2% no meio rural e 2,7% na população em geral, elevando-se para 3,2% com a inclusão do estado de São Paulo, segundo o inquérito nacional realizado entre os anos de 1975-1980 (FURUCHO, 2006). Nos anos 70, o Estado de São Paulo iniciou o combate ativo contra o *Triatoma infestans* com programa de borrifação de inseticidas em residências onde ele era encontrado, visando sua completa erradicação, uma vez que esse triatomíneo foi o que melhor se adaptou ao domicílio humano. Esta espécie foi erradicada nos anos 80, o que propiciou a diminuição radical da transmissão da doença de Chagas por via vetorial. Outros Estados brasileiros foram aderindo à campanha de erradicação do *T. infestans* aumentando a eficácia do programa (SCHUMUNIS, 1997).

No Estado do Paraná o *Triatoma infestans* foi encontrado pela última vez em 1991 segundo a FUNASA/PR. Silveira e Vinhaes (1998), não encontraram espécies de *Panstrongylus megistus* e nem *Triatoma sordida* nos anos de 1995-1997 no Paraná. Pesquisas recentes verificaram que 12,7% das unidades domiciliares rurais no noroeste do Paraná tanto habitadas quanto desabitadas, apresentavam-se infestadas por ninfas e insetos adultos de *Triatoma sordida* e de *Panstrongylus megistus*, onde 13,5% destes estavam infectados por *T. cruzi*. (ARAÚJO *et al.*, 2004). Porém, segundo o inquérito epidemiológico nacional realizado em 1980 (SILVEIRA e REZENDE, 1994), encontraram uma prevalência de 4% para doença de Chagas no Estado do Paraná e estimaram em 166.511 o número de casos positivos numa população de 4.164.943 habitantes. O Paraná aderiu à campanha de erradicação do *Triatoma infestans*, e essa espécie não é mais encontrada nos municípios do Estado do Paraná, ao ponto de terem recebido o certificado de erradicação intradomiciliar no ano de 2005 (CAMARGO, 2007). Mas, outros vetores ainda se encontram por aqui e estão parasitados (SOCCOL *et al.*, 2002; KOPP, 2002), o que levanta alerta para novas vias de transmissão, uma vez que, as autoridades não continuem as campanhas de borrifação de inseticidas e achem que os focos de triatomíneos infectados se acabaram. É necessário continuar sempre em alerta para o risco de outras espécies de triatomíneos tomarem o lugar do *Triatoma infestans* em residências e peridomicílios como principal ator vetorial na transmissão da infecção humana.

Os focos de *T. infestans* foram controlados em todo o Brasil com exceção dos Estados de Tocantins e da Bahia (SILVEIRA *et al.*, 2000). Com isso houve uma mudança de perfil epidemiológico da doença de Chagas graças à grande migração do campo para as grandes cidades, assumindo importância outras vias de contaminação tais como a transfusional, congênita, transplante de órgãos e por acidentes laboratoriais (DIAS *et al.*, 2000).

O risco de receber uma bolsa de sangue contaminada por *T. cruzi* é de aproximadamente 20% nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No Brasil, a prevalência média anual de amostras coletadas em hemocentros de todo o País é de 0,9% de pacientes rejeitados por motivo da infecção por *T. cruzi* cujos dados foram registrados no Ministério da Saúde em 1998. Na entrevista a taxa de rejeição dos doadores em hemocentros públicos mostram 22% de rejeição e 12,5% rejeitados posteriormente à entrevista clínica pela triagem sorológica, destes 0,9% são contaminados por *T. cruzi*.

O relatório de 2000 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aponta prevalência de 0,6% em doadores de sangue positivos para doença de Chagas, variando de 0,3% na região Sul e 1% na região Centro-Oeste. Já o relatório de 2002 do mesmo órgão a taxa de inaptidão sorológica brasileira para a doença de Chagas foi de 0,6% em bancos de sangue. No ano de 2005 Wendel encontrou uma prevalência de 0,49% indicando que a triagem sorológica no Brasil tem sido eficiente em diminuir a transmissão por meio transfusional. A atual norma estipulada pela ANVISA para Bancos de sangue, regida pela RDC número 153, anexo VIII de 14/06/2004 estabelece que a triagem para a doença de Chagas deverá ser realizada por apenas um teste imunoenzimático de alta sensibilidade (antes eram dois testes sorológicos por métodos diferentes).

Tão diferente quanto à prevalência a morbidade também depende da região notando-se que as formas digestivas da doença crônica são raras no norte do Equador, e, que a cardiopatia chagásica é mais evidente e grave em áreas do Brasil Central, em comparação com alguns setores do Rio Grande do Sul ou da América Central (BORGES PEREIRA e COURA, 1993; DIAS, 1993; PRATA, 1975).

Atualmente as crescentes migrações das populações mais humildes para países da América do Norte ou União Européia à procura de melhores condições de vida, trazem um risco muito grande de transmissão de doença de Chagas por via

transfusional, pois, nesses países, não é obrigatória a sorologia para doença de Chagas em Bancos de Sangue por não serem considerados áreas endêmicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A doença de Chagas, como qualquer outra doença deve ser tratada como um problema de saúde mundial, pois com as facilidades de deslocamentos observadas nos últimos anos, as doenças em geral deixam de ser problemas específicos de um país em questão para ser um problema de todos.

Com a eliminação dos focos de transmissão vetorial da doença de Chagas por aplicação de inseticidas em moradias infestadas por triatomíneos o risco de transmissão vetorial intradomicílio tornou-se próximo à zero. Hoje a maior preocupação das autoridades sanitárias do Brasil tem sido a transmissão oral principalmente na região amazônica, causada por vetores silvestres (COURA *et al.*, 2005).

No início não se acreditava que a doença de Chagas poderia ser transmitida por via oral (ingestão do *T. cruzi*), mas, estudos mais acurados demonstraram que essa enfermidade pode ser veiculada através de alimentos contaminados com *T. cruzi*, ou por fezes dos triatomíneos ou por trituração dos mesmos junto com os alimentos. No meio silvestre já é provado que os animais que se alimentam de insetos (triatomíneos contaminados), adquirem o flagelado e se tornam reservatórios da doença (DEANE, 1984).

Um dos primeiros relatos sobre contaminação por via oral em humanos foi registrado nos anos 60 na cidade de Estrela no Rio Grande do Sul, numa escola tipo internato atingindo cerca de 30 crianças com 6 óbitos, a suspeita foi a invasão da cozinha da escola por gambás contaminados que deixaram secreções cheias de parasitas contaminando os alimentos da escola (BRAZ-ALMEIDA, 2006).

Há também o registro nos anos 80 de outro surto agudo veiculado pelo caldo de cana servido num casamento na Paraíba numa cidade por nome Catolé da Rocha, neste surto houve uma morte e 26 contaminados. Suspeita-se que o triatomíneo foi moído junto com a cana (UMEZAWA, 1996).

Em fevereiro de 2005 houve um surto agudo no Estado de Santa Catarina na cidade de Navegantes, num quiosque na beira da BR 101, também envolvendo o caldo de cana que foi servido com triatomíneo triturado, contaminando 24 pessoas e

matando três pessoas da mesma família, o que foi amplamente divulgado pela mídia (Folha de São Paulo, 29/07/2007, STEINDEL *et al.*, 2005).

No mesmo período houve um surto de doença de Chagas agudo no Estado do Amapá, porém o *T. cruzi* estava no suco de açaí, fruto conhecido na região e de muita importância na alimentação da população e de grande potencial econômico, foram acometidas em torno de 32 pessoas (BRAZ-ALMEIDA, 2006).

Recentemente foram noticiados em jornais nacionais (Folha de São Paulo, 29/7/2006), novos surtos agudos envolvendo alimentos na Amazônia, sendo que o Ministério da Saúde registrou desde junho de 2006 até agosto de 2007 quinze surtos de doença de Chagas agudo sendo o veículo mais importante o suco de açaí contaminado ou o bacaba (açaí branco). De acordo com o Instituto Evandro Chagas, de 1968 até 2005 foram registrados, em média, 12 casos de micro-epidemias por ano na região amazônica por via oral. Em média seria um novo caso a cada quatro dias.

O Ministério da Saúde aponta algumas hipóteses para essa nova modalidade de transmissão: o desmatamento da Amazônia dificultando a oferta de alimentos para os triatomíneos; a subnotificação dos casos de transmissão por via oral e a falta de higiene dos moradores da região ao triturar o fruto para obtenção de suco, não verificando se o moedor ou triturador está infestado por triatomíneos que são atraídos para perto das moradias, pela luz, à noite se abrigando nesses locais por serem escuros.

Estes surtos têm resultado como micro-epidemias geralmente no âmbito familiar contaminando parentes e amigos. Todos os casos ocorreram em zonas rurais, estando bem ligados à forma artesanal com que o alimento é preparado.

No norte e nordeste brasileiro o açaí é mais consumido que o arroz e feijão o são no restante do País. Ele tem alto valor nutritivo e é importante na economia da região, pois é uma fruta largamente empregada em indústrias alimentícias.

A vigilância epidemiológica implantou um sistema na região para diminuir as subnotificações. A medida consiste em fazer pesquisa de *T. cruzi* em gota espessa sempre que for solicitado exame para malária que é foco importante na região (BRASIL/ANVISA, 2005).

Outra manifestação da transmissão oral registrada na literatura é pelo leite materno, porém os casos registrados são muito raros e os benefícios trazidos pelo

aleitamento contra os riscos esporádicos de transmissão de doença não justificariam as mães chagásicas deixarem de amamentar suas crianças (RASSI *et al.*, 2004).

A via congênita também é passível de transmissão às crianças de mães chagásicas, mas os casos relatados na literatura são poucos. Em países sem vigilância para doença de Chagas, a contaminação aos bebês através da placenta é mais comum, devendo essas mães ser monitoradas junto aos seus bebês todo o tempo, pois a doença é curável na forma congênita. Porém, essa via não é a principal, estando mais restrita às mulheres em período fértil e que são portadoras da doença de Chagas crônica (AMATO-NETO, 1997).

3.6 RESERVATÓRIOS

Tão importante quanto conhecer os vetores da doença de Chagas é conhecer os seus reservatórios na natureza, tanto no meio silvestre quanto no meio doméstico. Isto facilitará os estudos sócio-epidemiológicos da tripanossomíase americana para o seu controle. Diversos animais participam como reservatórios do *T. cruzi*, mas os mais importantes são os reservatórios sinantrópicos, ou seja, aqueles capazes de aproximar os triatomíneos do homem. Neste contexto tem especial atenção os marsupiais e os roedores, pois o desmatamento tem obrigado esses animais a invadir domicílios humanos à procura de alimentos. Um estudo de Deane, nos anos 80, e relatado por Dias (1997), cita a capacidade dos gambás de transmitirem o *T. cruzi* por suas secreções, pois o flagelado pode se desenvolver nas glândulas anais dos gambás brasileiros. Contudo o tripanossomatídeo não parece ser nocivo aos gambás, bem como aos reservatórios silvestres mais importantes.

De modo geral os reservatórios compreendem vários gêneros de reservatórios tanto silvestres quanto domésticos. Eles se dividem em:

a) Marsupiais: nesta família estão os gambás de diversas espécies, sendo muito propagados no meio rural e algumas cidades menores.

b) Roedores: aqui são representados por ratos e cobaias silvestres, além de servirem de alimentos para outros animais maiores, podendo contaminá-los por via oral.

c) Desdentados: como os tatus e alguns tamanduás que vivem em tocas muitas vezes também infestadas por *Panstrongylus geniculatus*. Eles podem apresentar taxas de até 50% de contaminação por *T. cruzi*.

d) Quirópteros: são várias espécies de morcegos naturalmente infectados pelo *T. cruzi* e até por outros tripanossomatídeos não patogênicos ao homem. Os morcegos se infectam porque algumas espécies de triatomíneos gostam de viver em cavernas e árvores ocas, convivendo assim com os morcegos.

e) Outras ordens como os carnívoros que se alimentam de ratos infectados tais como os gatos do mato e cães selvagens, furão, iraras, onças, etc., também os lagomorfos como coelhos e lebres podem ser reservatórios, mas em pequena proporção. Alguns primatas como os macacos comedores de insetos podem se infectar através desta via como os sagüis.

f) Aves e lagartos podem servir como fonte de alimento aos triatomíneos, porém são refratários ao *T. cruzi*. Eles adquirem importância quando os triatomíneos se alojam em pombais, galinheiros, próximos às moradias humanas. Podem ser transportados pelas aves entre as suas plumagens.

Neste âmbito, alguns lagartos e lagartixas e alguns sapos e rãs podem servir de fonte alimentar para triatomíneos mesmo sendo refratários à doença. Nesta linha é importante a associação do *Triatoma rubrovaria* com lagartos e lagartixas em cercas e pedregais no Uruguai e Rio Grande do Sul (SCHOFIELD, 1994).

g) Animais domésticos, neste estão inclusos os cães e gatos que podem adquirir a doença ingerindo o inseto, ou o rato contaminado. O convívio estreito entre estes animais e o homem pode facilitar a aproximação deste último com o vetor.

h) O próprio homem contaminado serve como reservatório, pois servirá de repasto para outros triatomíneos perpetuando o ciclo.

3.7 TRATAMENTO

O tratamento da doença de Chagas está na base de apenas um medicamento no mercado cujo nome químico é N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida, foi revelado, em animais de experimentação, um tripanossomicida contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do

T.cuzi. O nome genérico é benzonidazol, o mecanismo de ação está na inibição da síntese de proteínas e de RNA, tanto nos tripomastigotas metacíclicos extracelulares como nos amastigotas intracelulares (CANÇADO, 2005).

O Ministério da Saúde elaborou um manual sobre o tratamento etiológico, destinado aos médicos que atendem os pacientes na rede do Sistema Único de Saúde, recomendando as seguintes indicações: infecção aguda, infecção congênita, infecção crônica recente (incluindo todas as crianças e adolescentes soropositivos), infecção crônica na forma indeterminada e formas clínicas iniciais (Ministério da Saúde, 1996).

Alguns autores contestam as recomendações do Ministério da Saúde, afirmando que pacientes chagásicos crônicos não inclusos no rol de pacientes que deveriam ser tratados, também se beneficiariam do tratamento, justificando que todo o chagásico deveria ser tratado independente do seu estágio.

Na fase aguda, independente do modo do contágio todos devem ser tratados, pois 60% deles podem ser curados tanto em termos parasitológicos quanto sorológicos. Na transmissão congênita o tratamento torna-se eficaz quanto mais próximo do parto ele for instituído. Na fase crônica o tratamento está indicado nos casos de infecção recente, sendo, na prática, instituído para todas as crianças com sorologias positiva e adultos jovens com a forma indeterminada (Ministério da Saúde, 1996).

Segundo o documento da Gerência Técnica da Doença de Chagas redigido em 1996 (Ministério da Saúde, 1996), é válido o tratamento das formas crônicas indeterminadas, da forma cardíaca assintomática e da forma digestiva com coração normal ou comprometido de maneira incipiente. Existindo megaesôfago, recomenda-se realizar tratamento sintomático do mesmo, para assegurar o livre trânsito do alimento e sua absorção. A droga usualmente empregada é o benzonidazol 7-10 mg/Kg, durante 10 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Em casos de transplantes de órgãos em pacientes sabidamente chagásicos que poderiam reativar a doença por causa dos fármacos imunossupressores, o tratamento seria o benzonidazol na dose de 5 mg/Kg durante 60 dias.

Outra droga utilizada é o Nifurtimox em adultos 8-10 mg/Kg/dia, durante 60 a 90 dias, mas infelizmente não existe mais no mercado (CANÇADO, 2005).

Esses fármacos são tóxicos e apresentam diversos sintomas adversos tais como epigastralgia, hiporexia, náusea, vômitos e emagrecimento. Também podem ocorrer reações hematológicas por hipersensibilidade como leucopenia e plaquetopenia por vezes com púrpura e agranulocitose. Há ainda outras reações como dermatites e sintomas desconhecidos de acordo com a resposta idiossincrática de cada paciente. Não é recomendável a administração do medicamento para pacientes grávidas (CANÇADO, 2005).

Hoje com as pesquisas em células tronco está se levantando um novo método de tratamento para aqueles pacientes cardiológicos fortemente comprometidos. Existem alguns pesquisadores que estão combinando células-tronco retiradas da medula óssea e células mioblásticas esqueléticas (retiradas do músculo da coxa) do próprio paciente (SOUZA *et al.*, 2007). Segundo o autor as células-tronco ajudam na regeneração dos vasos sanguíneos, mas tem capacidade limitada. Já as células mioblásticas esqueléticas funcionam na regeneração do músculo cardíaco.

No caso das doenças digestivas, dependendo do grau de lesão somente medicamentos ou até mesmo cirurgias estão recomendadas (MACEDO, 1997).

No megaesôfago, os médicos procuram relaxar o esfíncter do esôfago para que o alimento passe mais livremente e, desse modo, alivia o sintoma dos pacientes que sofrem do mal do engasgo, mas casos mais graves necessitam de cirurgia (SILVA, 1997).

3.8 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para se fazer um diagnóstico laboratorial correto da doença de Chagas humana se faz necessário conhecer qual o estágio da doença que o paciente se encontra. Na doença aguda, cuja parasitemia se encontra intensa na circulação sanguínea do indivíduo, é mais precisa a demonstração do parasito por meio de esfregaço do sangue periférico do paciente, ou de gota espessa. Também pode ser realizado o exame à fresco sendo fácil de observar o *T. cruzi* pelo movimento do seu flagelo. Na fase aguda, a hemocultura terá grandes chances de ser positiva, bem como o xenodiagnóstico. Esses exames são chamados de exames parasitológicos, pois estão baseados na demonstração do parasito na corrente sanguínea do

paciente sendo considerados exames “padrão-ouro”, ou exames de evidência, porque uma vez encontrado o parasita não resta dúvidas da contaminação do indivíduo.

O xenodiagnóstico requer a criação no laboratório de ninfas de triatomíneos, e é necessário saber escolher qual a espécie de triatomíneo para que o exame tenha êxito. Existe a possibilidade de perdas de insetos durante o período de testes, bem como a rejeição por parte dos pacientes à aplicação do exame ao natural. Outra possibilidade é a alergia que alguns pacientes podem experimentar com a picada do inseto. Ainda na fase aguda pode ser empregado o teste de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de IgM contra *T. cruzi*. Este exame é bastante útil principalmente no recém-nato, quando se suspeita de doença congênita, pois o IgM não atravessa a barreira transplacentária sendo anticorpos do próprio paciente.

Na fase crônica a parasitemia diminui muito sendo quase impossível o encontro do flagelado por meio de gota espessa ou esfregaço de sangue periférico corado pelo método Giemsa. Nesta fase os exames parasitológicos mais viáveis são justamente os métodos de xenodiagnóstico ou a hemocultura. O problema reside no tempo gasto para esses exames, pelo menos de 90 dias para se ter um resultado satisfatório. Alguns autores encontraram positividade que varia entre 9 a 87,5%, que depende da espécie de triatomíneo trabalhada, e número de ninfas utilizadas para cada exame, quanto maior o número mais chances de positividade se tem. Também depende das repetições do exame, quanto mais for repetido por paciente, maiores serão as chances de se obter um resultado positivo (PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003).

A hemocultura é mais aceita que o xenodiagnóstico por parte do paciente, mas também é demorada, devendo ser colhida uma quantidade mínima de 30 ml para se obter mais êxito. Se o pesquisador repete o exame no paciente tem mais chances de encontrar positividade (CHIARI *et al.*, 1999). Tanto quanto o xenodiagnóstico, a hemocultura também é um exame demorado que requer repicagens freqüentes e um controle rígido do ambiente e dos meios de cultura para se evitar a contaminação com bactérias ou fungos, o que prejudicaria o resultado do exame. A sensibilidade é baixa, porém a especificidade é alta e inquestionável. Existe uma grande variedade de porcentagem de exames positivos utilizando essa

técnica de acordo com diversos autores, isso depende da técnica empregada, bem como do meio de cultura e as condições que as hemoculturas são realizadas. As taxas de positividade para hemocultura ficam entre 0 a 94% (PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003). De qualquer modo, se observa maior sucesso naqueles trabalhos em que os pesquisadores colheram mais de três vezes do mesmo paciente em tempos diferentes, com maior volume de sangue de até 30 mL, e maior tempo de observação, usando meio de LIT ou ágar sangue com sangue de coelho conhecido como meio de Tobbie-Evans, e menor tempo de processamento entre a coleta e a semeadura no meio de cultura.

As técnicas indiretas como os exames sorológicos vieram resolver o problema da baixa sensibilidade dos exames parasitológicos na fase crônica da doença de Chagas, pois o hospedeiro apresenta altos níveis de anticorpos contra o parasito que permanecem por muitos anos. Assim sendo, o primeiro teste a ser padronizado para o diagnóstico laboratorial foi o teste de Machado-Guerreiro (1913), que se baseava na fixação do complemento usando como antígenos extratos de órgãos de cães infectados com *T. cruzi*. Com o tempo e melhores conhecimentos sobre a doença vieram outros métodos sorológicos com boa sensibilidade e especificidade, tais como os métodos de enzima-imunoensaio (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) (PESSOA, 1987).

A desvantagem da técnica de Machado-Guerreiro é a padronização ao longo do tempo, muito difícil de ser obtida e que caiu no desuso, principalmente porque encontraram muitas reações cruzadas com indivíduos com hanseníase (PESSOA, 1987).

No ano de 1947, Muniz empregou a hemaglutinação para o diagnóstico da doença de Chagas. Ele usou hemácias sensibilizadas por uma fração polissacarídea extraída do parasito. Adicionou complemento e descreveu a reação como “hemólise condicionada”. Outros autores colaboraram utilizando hemácias tratadas com ácido tânico e adsorvidas com frações de *T. cruzi* (MAECKELT *et al.*, 1964).

Neal e Miles (1970) utilizaram hemácias de carneiro sensibilizadas com antígenos de culturas de *T. cruzi*. Camargo e colaboradores (1974) usaram eritrócitos tratados pelo cromo e formalina e obtiveram resultados satisfatórios com essa técnica, mas encontraram reações cruzadas com leishmaniose.

Em 1959, Fife e Muschel foram os primeiros a padronizar a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para doença de Chagas utilizando formas de *T. cruzi* em tubos. Camargo em 1966 padronizou a reação de IFI em lâminas, e em 1974, descreveu a vantagem de se utilizar a técnica de IFI em laboratórios clínicos, pois é possível utilizar reagentes padronizados como os conjugados anti-globulínicos marcados com fluoresceína, os sais reagentes para a técnica e utilizar o próprio parasita (epimastigota), vindas de cultura sem necessidade de processos de extração ou fracionamento. Também é possível pesquisar a fase aguda ou crônica da doença, uma vez que se use conjugado específico, ou seja, IgG para a fase crônica e IgM para a fase aguda. Neste método também se observa reação cruzada com leishmaniose, não sendo um método 100% específico, mas a sensibilidade está em torno de 95% (CAMARGO, 1979). Para o procedimento, o laboratório deve possuir microscópio de imunofluorescência, sala escura para visualização da fluorescência, e um técnico habilitado para a leitura, sendo possível somente em laboratórios credenciados.

Os métodos imunoenzimáticos (ELISA), foram padronizados na década de 70. A sensibilidade é próxima ao teste de IFI e a especificidade também, mas apresenta reação cruzada com leishmaniose, não sendo 100% específico (FERREIRA *et al.*, 1991). Por outro lado, trouxe vantagens adicionais, pois é possível fazer muitos pacientes por vez, diferentemente da técnica de IFI, além de utilizar um leitor de densidade óptica, dispensando a leitura do técnico na microscopia. Essa técnica tornou possível a execução de grande quantidade de exames em bancos de sangue, por exemplo, na triagem de doadores de sangue, além de poderem ser automatizadas para facilitar a rotina de exames no laboratório.

Os métodos sorológicos são alicerces no diagnóstico da doença de Chagas crônica devido à boa sensibilidade e especificidade, pois os níveis de anticorpos são demonstráveis décadas após a infecção (VATTUONE *et al.*, 1976; KIRCHHOFF *et al.*, 1993). Por outro lado, os títulos de anticorpos não guardam correlação com o estágio da doença, não servindo para avaliar se a doença recuou ou está em pleno desenvolvimento até se transformar nas formas graves (GALVÃO *et al.*, 1993).

As formas epimastigotas, a especificidade é prejudicada por reações cruzadas com leishmaniose (CAMARGO *et al.*, 1974; CHILLER *et al.*, 1990, VELÁSQUEZ *et al.*, 1992). Grande número de resultados pode ser caracterizado

como inconclusivo ou indeterminado (SALLES *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1990) em candidatos a doadores de sangue, pela discordância entre os resultados das provas convencionais, inclusive após várias repetições.

A Imunofluorescência indireta tem grande valia como teste de referência quando feita por pessoa habilitada (CAMARGO e SOUZA, 1966).

O teste de ELISA quando empregado antígenos de extrato alcalino de forma epimastigota tem alta sensibilidade em doentes crônicos, porém menor especificidade que os antígenos na forma tripomastigota (UMEZAWA *et al.*, 1996).

Moléculas recombinantes e peptídeos sintéticos têm sido testados em ensaios imunoenzimáticos com diferentes graus de eficiência. Vergara *et al.*, (1992), observaram 98% de positividade em chagásicos com um ou mais de cinco peptídeos sintéticos clonados do antígeno de *T. cruzi*; Ferreira *et al.*, em 2001, observaram para quatro peptídeos sintéticos 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade, Peralta *et al.*, 1994 detectaram para dois peptídeos sensibilidade de 99,4% e especificidade de 98%. Índices similares foram registrados com antígenos recombinantes (PARANHOS-BACALLA *et al.*, 1994; PERALTA *et al.*, 1994; GODSEL *et al.*, 1995; KRAUTZ *et al.*, 1995; UMEZAWA *et al.*, 1999). Krieger *et al.* em 1992 utilizaram misturas de antígenos recombinantes (CRA-FRA) alcançando 98% de sensibilidade e 100% de especificidade. O emprego de antígeno recombinante FcaBP por Godsel *et al.* em 1995 permitiu observar 100% de sensibilidade e especificidade com seis antígenos recombinantes H49, JL7, A13, B13, JL8 e IF8, a sensibilidade variou de 79 a 100 % e a especificidade de 96,2 a 99,6% (UMEZAWA *et al.*, 1999), com melhor desempenho isolado de IF8 (sensibilidade de 99% e especificidade de 99,6%).

A quimioluminescência pode ser utilizada com melhor desempenho de mucina de formas tripomastigotas em relação às formas epimastigotas, com 100% de índices de sensibilidade e especificidade em amostra de soro de pacientes com hemocultura ou xenodiagnóstico positivo e 12,2% em amostras inconclusivas (ALMEIDA *et al.*, 1997). O equipamento é muito oneroso e somente laboratórios de porte poderiam executar essa metodologia, mas a vantagem é que apresentam baixo risco de reação cruzada.

Outra técnica muito importante é o Imunoblot com antígenos secretados e excretados de formas tripomastigotas (TESA), (UMEZAWA *et al.*, 1996 e UMEZAWA

et al., 2001, AMATO-NETO, 2005), essa técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade chegando a quase 100% (SILVEIRA-LACERDA *et al.*, 2004). A desvantagem é o custo elevado chegando a 20 dólares por teste e a necessidade de manipulação de formas tripomastigotas para a obtenção do antígeno TESA.

Atualmente os estudos de Biologia Molecular estão sendo empregados tanto em testes confirmatórios para doença de Chagas, bem como para acompanhamento do paciente chagásico crônico. São vários os iniciadores registrados no GenBank que poderiam ser utilizados como alvo para as reações de Cadeia da Polimerase (PCR), e cada alvo analisado pelos diversos estudos apontam um resultado diferente de outro.

A reação de PCR foi descrita por Kary Mullis (MATIOLI *et al.*, 2001), ele amplificou DNA genômico de bactérias.

Baseado na técnica de PCR, mas usando amplificação de fragmentos oriundos do DNA genômico do *T. cruzi* ou do DNA de minicírculos do cinetoplasto do parasito (k-DNA), este procedimento pode ser empregado em amostras de sangue de pacientes chagásicos e fezes de triatomíneos (BRENIÈRE *et al.*, 1995; RUSSOMANDO *et al.*, 1996), ou em outros materiais biológicos (LUQUETTI e RASSI, 2000), detectando o DNA de um único parasita ou frações do mesmo, com ausência de reações cruzadas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1996).

Em estudos de seguimento terapêutico com testes periódicos e sistemáticos dos indivíduos, recomenda-se utilização de técnica molecular associada à sorologia (BRITTO *et al.*, 2001).

A PCR foi capaz de detectar *T. cruzi* em dois pacientes, a partir de amostras de sangue periférico, 30 dias antes do aparecimento de sinais e sintomas sugestivos de reativação da doença (MALDONADO *et al.*, 2004).

A PCR parece constituir instrumento diagnóstico valioso, notadamente no caso de doenças infecciosas graves, devido à sua capacidade para detectar agentes infecciosos com maior sensibilidade e especificidade (SILBER *et al.*, 1997), sem necessidade de se encontrarem viáveis na amostra biológica.

Para os recém-natos o diagnóstico rápido é essencial para a introdução precoce do tratamento antiparasitário (VIRREIRA *et al.*, 2003).

Para os pacientes rejeitados pelo Banco de Sangue, também é fundamental o diagnóstico de certeza no intuito de diminuir a ansiedade nesses indivíduos para

confirmar ou não a doença de Chagas, uma vez que essas pessoas se sentem “sadias”, ou seja, não apresentam qualquer sintoma de doença (forma indeterminada).

Os métodos moleculares teriam uma maior rapidez e melhor sensibilidade em comparação com os testes considerados padrão-ouro como os parasitológicos.

Sua aplicação na rede de Saúde Pública se justificaria se tiver maior sensibilidade, especificidade e que seja de fácil execução. Por esta razão o presente trabalho visa padronizar e testar a técnica de PCR para diagnóstico de pacientes chagásicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas pertencente à Universidade Federal do Paraná sendo aprovado a coleta das amostras e realização da pesquisa sob número 1161.009/2006-01. Antes da coleta, cada paciente foi consultado e preencheu o termo de livre consentimento exigido pelo Comitê de Ética e concordou com a pesquisa (anexo 4). Também preencheram um questionário epidemiológico (anexo 3).

Para a realização deste trabalho foram colhidas amostras de sangue de 34 pacientes chagásicos cadastrados no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas de Curitiba, 33 pacientes do Ambulatório de Endoscopia Per Oral e 01 paciente do serviço de gastroenterologia do mesmo hospital.

Também foram colhidas cinco amostras de sangue de pacientes de algumas Regionais de Saúde do Estado do Paraná para confirmação do diagnóstico de doença de Chagas, estes pacientes eram provenientes do surto de doença de chagas em Santa Catarina em 2005. Foram triadas 7000 amostras para análise de doença de Chagas aguda, dos quais três pacientes foram positivos para IgM e 139 positivos para IgG, desses foram escolhidos três casos agudos e dois crônicos para este trabalho. Fora o surto, alguns locais no interior do Estado do Paraná foram encontrados triatomíneos nas moradias e, assim, quatro amostras de sangue de residentes naquelas áreas (1 paciente de Cambé e 3 pacientes de Planalto) também foram encaminhados ao LACEN-Pr e incluídos nesse trabalho. No total foram analisadas 77 amostras (tabela 7).

De cada paciente foram coletados 30 mL de sangue venoso os quais foram divididos em 3 tubos sendo um tubo com EDTA para extração de DNA, outro tubo com heparina para ser utilizado na hemocultura, e outro sem anticoagulante para separar o soro e proceder às provas de IFI com pesquisa de anticorpos IgG e IgM, e ELISA (IgG). Assim, cada paciente teve um exame parasitológico (hemocultura), dois exames sorológicos IFI e ELISA e um exame de Biologia Molecular (PCR).

Após a coleta de sangue, os tubos foram assim distribuídos: o tubo contendo EDTA foi centrifugado e colhido o creme leucocitário (*buff coat*), separado em tubos de criobiologia estéreis e guardado à -20°C até a extração de DNA.

O tubo sem anticoagulante foi centrifugado para separação do soro para os métodos sorológicos (IFI e ELISA). O tubo com heparina foi utilizado para hemocultura com meio de Tobbie-Evans para o isolamento do *T. cruzi*.

TABELA 7 – AMOSTRAS DE SANGUE DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM DOENÇA DE CHAGAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO PARA AVALIAÇÃO PELAS TÉCNICAS DE IMUNODIAGNÓSTICO (IFI E ELISA) E MOLECULAR (PCR)

Local	Mulheres	Homens	Total
Amb. Doença Chagas	25	9	34
Endoscopia Per-Oral	17	16	33
Surto agudo/2005	4	1	5
Outros	2	2	4
Hospital de Clínicas	1	0	1
TOTAL	49	28	77

NOTA: Outros são pacientes da Secretaria de Saúde (SESA), provenientes do norte do Estado atendidos pelo SUS e cujas amostras são encaminhadas ao LACEN – PR para diagnóstico laboratorial.

4.1.2 Cepas de *Trypanosoma cruzi* Isoladas em Culturas

Foram isoladas várias cepas de *T. cruzi* quer seja de reservatórios (*Didelphis marsupialis*) vetor (*Panstrongylus megistus*), e de pacientes diagnosticados com doença de Chagas, quer seja de casos agudos como crônicos (tabelas 8 e 9), num total de 28 culturas.

De pacientes humanos foram isoladas cinco culturas de *T. cruzi* sendo três pacientes chagásicos crônicos com doença cardíaca, um paciente crônico com doença intestinal, todos do Hospital de Clínicas e um paciente do surto de Santa Catarina em 2005, portanto com doença aguda, proveniente da cidade de Joinville, mas foi atendido no Hospital N^a Sr^a das Graças em Curitiba, e foi o que apresentou título de IgM mais alto e foi incluso no trabalho.

Estas cepas foram criopreservadas no banco de cepas de *Trypanosoma* e *Leishmania* do laboratório de Parasitologia Molecular/UFPR, (esse banco já conta

com mais de 350 cepas armazenadas em nitrogênio líquido, catalogadas sob a sigla CUR seguida de numeração correspondente a ordem de entrada).

Para fazer o teste de especificidade foram testados três DNA de culturas de *Leishmania*, sendo duas culturas de *L. braziliensis* e uma cultura de *L. amazonensis* (tabela 10) e duas culturas de *T. rangeli* cedidas gentilmente pelo doutor Mário Steindel da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo uma isolada de Santa Catarina SC-58 e uma isolada na Colômbia (CHOACHI) de triatomíneos do gênero *Rhodnius*.

TABELA 8 – CEPAS DE TRYPANOSOMATIDAE ISOLADAS DE TRIATOMÍNEOS E RESERVATÓRIOS COM SUA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E NÚMERO DE CÓDIGO

Sigla	Vetor/Reservatório	Localização	Código Internacional
CUR 70	<i>P. megistus</i>	Arapongas	IPAN/BR/98/CUR70
CUR 89	<i>M. m. brevisrostris</i>	Norte do Paraná	MROE/BR/99/CUR89
CUR 90	<i>P. megistus</i>	Londrina	IPAN/BR/98/CUR90
CUR 93	<i>D. marsupialis</i>	Londrina	MDIP/BR/98/CUR93
CUR 96	<i>D. marsupialis</i>	Cambira	MDIP/BR/99/CUR96
CUR 97	<i>P. megistus</i>	Jandaia	IPAN/BR/98/CUR97
CUR 98	<i>P. megistus</i>	Maringá	IPAN/BR/98/CUR98
CUR 99	<i>P. megistus</i>	Cambira	IPAN/BR/98/CUR99
CUR 100	<i>P. megistus</i>	Cambira	IPAN/BR/98/CUR100
CUR 101	<i>P. megistus</i>	Londrina	IPAN/BR/99/CUR101
CUR 104	<i>P. megistus</i>	Itambé	IPAN/BR/99/CUR104
CUR 105	<i>P. megistus</i>	Apucarana	IPAN/BR/99/CUR105
CUR 106	<i>P. megistus</i>	Arapongas	IPAN/BR/99/CUR106
CUR 107	<i>P. megistus</i>	Arapongas	IPAN/BR/99/CUR107
CUR 108	<i>D. marsupialis</i>	Arapongas	MDIP/BR/99/CUR108
CUR 115	<i>P. megistus</i>	Cambe	IPAN/BR/99/CUR115
CUR 116	<i>P. megistus</i>	Cambe	IPAN/BR/99/CUR116
CUR 138	<i>D. marsupialis</i>	Cambira	MDIP/BR/99/CUR138
CUR 139	<i>D. marsupialis</i>	Cambira	MDIP/BR/99/CUR139
CUR 143	<i>D. marsupialis</i>	Arapongas	MDIP/BR/99/CUR143
CUR 146	<i>D. marsupialis</i>	Arapongas	MDIP/BR/99/CUR146

NOTA: Total: 21

TABELA 9 – CEPAS DE TRYPANOSOMATIDAE ISOLADAS DE HUMANOS

Sigla	Sexo/Idade	Localização	Código Internacional
CUR 163	Fem. 43 anos	Salto do Itararé/Pr	MHOM/BR/00/CUR163
CUR 162	Masc. 45 anos	Araguari/MG	MHOM/BR/00/CUR162
CUR 164	Masc. 49 anos	Santa Rosa/RS	MHOM/BR/00/CUR164
CUR 165	Masc. 56 anos	Tomazina/Pr	MHOM/BR/00/CUR165
CUR 167	Masc. 45 anos	Salto do Itararé/Pr	MHOM/BR/00/CUR167
CUR 307	Masc. 37 anos	Navegantes/SC	MHOM/BR/06/SCCUR307
NAZ	Fem. 35 anos	Norte do Paraná	SEM CÓDIGO

NOTAS: Todos os pacientes estavam em estágio crônico da doença e eram procedentes do Hospital de Clínicas de Curitiba e um caso agudo de Santa Catarina.

Total: 7

TABELA 10 – CEPAS DE *LEISHMANIA* ISOLADAS DE HUMANOS E IDENTIFICADAS PREVIAMENTE E UTILIZADAS PARA VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE PCR

Sigla	Espécie	Localização	Código Internacional
CUR 22	<i>L. braziliensis</i>	Norte do Paraná	MHOM/BR/99/CUR22
CUR 78	<i>L. braziliensis</i>	Argentina	MHOM/AR/98/CUR2297
LEM 690	<i>L. amazonensis</i>	Brasil	MHOM/BR/73/M2269

4.2 HEMOCULTURA

No intuito de isolar o agente etiológico da doença de Chagas, procedeu-se ao exame de hemocultura de todas as amostras de humanos colhidas nesse trabalho. A hemocultura foi realizada no laboratório do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, utilizando o meio de Tobbie-Evans à base de ágar e sangue de coelhos. Para cada paciente foram utilizados em média 10 tubos, os quais foram repicados a cada semana por 4 semanas seguidas e após esse período, foram repicados uma vez por mês por até 8 meses de observação nos exames negativos. As culturas foram mantidas em estufa a 27°C.

Depois de isoladas as estirpes fez-se cultura de massa desses isolados em meio LIT ou RPMI, para obtenção de biomassa visando à extração do DNA para as etapas de PCR.

A biomassa de parasitos foi obtida a partir do conteúdo de garrafa de 100 mL de cultivo celular, livre de contaminações bacteriana e fúngica. O conteúdo da garrafa foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e centrifugados durante 20 minutos a 12000 x g na temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado foi lavado duas vezes com soro fisiológico a 0,3%. Posteriormente o precipitado foi transferido para tubos de criobiologia e centrifugado por 5 minutos a 10000 x g mantendo a temperatura a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado acrescido de 500 µL de tampão de Lise e estocado a -20°C até o momento da extração de DNA.

4.3 MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

4.3.1 Imunofluorescência Indireta

A IFI foi realizada no laboratório de Imunologia do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) utilizando antígeno liofilizado de *T. cruzi* de um kit comercial*.

O antígeno foi reconstituído com 1 mL de água destilada e aplicado cerca de 20 µL em lâminas extra-finas. Após a aplicação do antígeno as lâminas foram colocadas na estufa a 37°C por até 1 hora (mínimo de 30 minutos), para fixação do antígeno na lâmina, depois desse período elas foram embaladas com papel manteiga e papel alumínio e conservadas a -20°C até a sua utilização.

Cada exame foi realizado com conjugado IgM e IgG para pesquisa de fase aguda e fase crônica da doença de Chagas, respectivamente. As diluições utilizadas foram de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 em PBS pH de 7,2 produzidos no Setor de Reativos do LACEN para os testes de triagem (anexo 1). Nos casos em que foi positiva até a diluição 1/160, foi repetido o exame fazendo-se diluições até 1/2560, na razão 2 para se obter o título correto da amostra.

As diluições dos soros foram aplicadas nas lâminas conforme protocolo previamente estabelecido. Depois foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C. Em seguida foram lavadas duas vezes com PBS em cubas de Koplin, sendo cada lavagem de 5 minutos e uma última lavagem com água destilada para retirada de excesso de sal, depois foram completamente secas em estufa a 37°C para aplicação do conjugado específico. Novamente foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 30 minutos e lavadas com o anteriormente relatado

* ®Imunocruzi e ®Fluoline M e ®Fluoline G (Biomérieux)

para aplicar glicerina alcalina pH 9,4. Após execução desse procedimento as lâminas foram lidas em sala escura em um microscópio com epi-iluminação em luz ultravioleta, no aumento de 400 vezes. Os exames que apresentaram fluorescência foram considerados positivos. Para estabelecer o título do exame foi considerado positivo até a última diluição com fluorescência. Os exames que não apresentaram fluorescência foram considerados negativos para IFI.

Como ponto de corte foi considerado positivo os exames que deram títulos iguais ou superiores a 1/40 tanto para IgG quanto para IgM. Os exames que deram somente IgG positivo foi considerado doença crônica, e aqueles que deram só IgM positivos acompanhados ou não de IgG foram considerados casos agudos de doença de Chagas.

Em cada protocolo de IFI foram acrescentados controles positivos e negativos internos para validar o teste e estabelecer controle de qualidade interno.

4.3.2. Teste Enzimaimunoensaio (ELISA)

O teste ELISA foi realizado no Setor de Imunologia do LACEN utilizando kits comerciais*. Esse kit contém placas de poliestireno adsorvidas com antígeno de *T. cruzi* em suas paredes, apresenta tampão de diluição de amostras, tampão de lavagem com pH de 7,2 a 7,4 concentrado 25 vezes, mais o conjugado anti IgG humano marcado com TMB e tampão de conjugado pronto para uso. A reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico a 1N e a leitura realizada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm de comprimento de onda. O exame foi realizado conforme as instruções do fabricante, inclusive com as etapas de incubação, lavagem e leitura em aparelhos da própria Empresa que fabrica o produto em sistema de Comodato.

O ponto de corte da reação (*cut-off*) foi obtido com controles negativos do kit e controle positivo, sendo retirado a média dos controles negativos acrescidos de 0,100 conforme orientação do fabricante. A diferença entre os controles negativos e controle positivo deve ser superior a 0,300 de absorbância óptica para que o teste seja válido.

* Chagatek ® BIOMÉRIEUX.

A cada protocolo foi realizado novo ponto de corte, sendo que por segurança sempre foi acrescentado controles positivos e negativos internos para validar o kit. Os exames cuja absorbância foi acima do *cut-off* foram considerados positivos e os exames com absorbância abaixo do *cut-off* foram considerados negativos para doença de Chagas. Porém, os exames que ficaram 10% abaixo ou acima do ponto de corte (*borderline*) foram considerados indeterminados, sendo repetidos para comprovar essa condição ou passados para outro teste imunológico, ou ainda submetidos aos testes moleculares (PCR) para comprovar positividade ou não.

4.4 MÉTODO MOLECULAR

4.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em duas etapas e por métodos diferentes. Para as cepas de *T. cruzi* isoladas em culturas o protocolo de extração de DNA foi aquele proposto por Sambrook (1989). Para extração de DNA de *T. cruzi* em sangue de pacientes ou em sangue artificialmente contaminado para determinação da sensibilidade do método foi usado um kit comercial* de extração de DNA.

4.4.1.1 Extração de DNA de *T. cruzi* obtido em cultivo

Para extração do DNA de *T. cruzi* obtido em cultura no tubo de criopreservação foi acrescentado o tampão de lise pH 8,0 (tampão TE Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0), e submetido ao congelamento em nitrogênio líquido (-196°C) por 5 minutos, descongelado à 37°C por 5 minutos por três ciclos para romper a membrana celular.

Adicionou-se 5 µL de lizozima (100mg/mL), solução recente e incubou-se em banho-maria por 60 minutos. Depois foi adicionado 50 µL de solução de SDS a 5% e 2,5 µL de Proteinase K (20 mg/mL) incubando por 30 minutos a 55° C em banho-maria sob agitação. Congelado e descongelado três vezes como descrito acima e desnaturada a Proteinase K aquecendo-se a mistura à 95°C por 10 minutos,

* Nuclisens® BIOMÉRIEUX.

centrifugado os tubos a 1000 x g por 5 minutos, transferido o sobrenadante para novos tubos estéreis e acrescentado 5 µL de RNase (20 mg/mL). Em seguida foi incubado em banho-maria sob agitação por 30 minutos na temperatura de 37°C.

A seguir foi feito a extração de proteínas com fenol-clorofórmio (volume a volume), homogeneizou-se lentamente e a seguir foi centrifugado por 5 minutos a 12000 x g, sempre recuperando o sobrenadante. Este processo foi repetido 3 vezes até a fase estar límpida e sempre passando para novos tubos estéreis. A seguir foi realizado a fase do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), com centrifugação de 12000 x g por 5 minutos, recuperando o sobrenadante.

Para precipitar o DNA foi adicionada uma solução de acetato de sódio a 3M 1/10 de volume final e dois volumes de etanol PA gelado (4°C) e, após, centrifugado a 4°C por 30 minutos a 12000 x g, o sobrenadante foi i desprezado e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol a -20° e centrifugado por 15 minutos a 12000 x g mantendo-se a temperatura a 4°C. Após essa fase, o DNA precipitado foi seco em estufa a 37°C por 10 minutos. Esse precipitado foi ressuspensionado com 100 µL de água ultrapura e guardado a 4°C por 12 horas e armazenado a -70°C até sua utilização.

Ao final das extrações de DNA dos protozoários obtidos em cultura foi feita a dosagem de DNA em espectrofotômetro com comprimento de onda em 260 nm e 280 nm. Os DNA(s) cujas concentrações foram superiores a 20 µg/mL, foram diluídos em água ultrapura e em novos tubos estéreis para 20 µg/mL, pois foi essa a quantidade que foi estabelecida para as extrações de cultura de *T. cruzi*.

4.4.1.2 Extração de DNA de *T. cruzi* em sangue dos pacientes

O *buff-coat* do sangue dos pacientes que foi previamente separado e guardado em freezer a -20°C, após a colheita do sangue, foi descongelado e submetido ao método de sílica-gel, também chamado de método de BOOM, o método segue o protocolo do kit comercial Nuclisens®BIOMÉRIEUX.

Colocou-se 10 µL de *buff-coat* em 900 µL de tampão de lise do kit que consiste numa solução tampão de Tiocinato de Guanidina 5 mol/L e deixou-se a 4°C *overnight* para romper a célula e expor o DNA. A adição da amostra a um tampão de

lise contendo tiocianato de guanidina e detergente Triton X-100, tem como princípio a solubilização de proteínas e dos lipídeos presentes na amostra. Desse modo, células são desintegradas, enzimas RNases e DNases são inativadas e o ácido nucléico é liberado. Após a lise, os ácidos nucléicos permanecem estáveis no tampão por períodos extensos à -70°C, por 14 dias e em temperatura de 2 a 8°C e por 48 horas em temperatura ambiente. Após essa fase inicia-se o processo de purificação do ácido nucléico. Qualquer ácido nucléico presente na amostra será, então, associado à sílica e imobilizado em fase sólida, permitindo a realização de sucessivas etapas de lavagens que eliminam por completo os materiais solubilizados presentes no sistema.

Depois da amostra adicionada ao tampão de lise acima descrito, o tubo com a amostra ficou *overnight* em geladeira a 4°C, fez-se um *spin* para abaixar o sobrenadante. Adicionou-se ao sobrenadante 50 µL de sílica-gel em cada tubo de extração e agitou-se bem em vortex. Em seguida agitou-se a cada 2 minutos até o tempo máximo de 10 minutos para então, ser centrifugado por 3 minutos a 10000 x g. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem que vem junto com o kit de extração. Agitou-se no vortex até completa dissolução da sílica no tampão e depois foi centrifugado a 10000 x g por 1 minuto. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se este processo mais uma vez. A seguir, adicionou-se 1 mL de etanol a 70% e agitou-se até completa dissolução da sílica, centrifugando-se a 10000 x g por 1 minuto, desprezando o sobrenadante. Foi repetido o processo com etanol e feito o mesmo com acetona PA, desta feita centrifugando o material na mesma velocidade, mas no tempo de 3 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e foi colocado o tubo aberto num termobloco a 56°C por 13 minutos até a acetona evaporar totalmente. O precipitado foi diluído com 100 µL de tampão de eluição do kit, o tubo foi colocado fechado novamente no termobloco por 10 minutos agitando-se completamente a cada 5 minutos. Depois foi centrifugado esse tubo por 5 minutos a 10000 x g, e assim foi guardado a -20°C até o momento de proceder a reação de PCR.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – PCR

A técnica de PCR consiste em fazer cópias de DNA *in vitro* usando os elementos básicos de replicação da célula e hoje se constitui o método de rotina para isolar rapidamente seqüências específicas a partir de uma mistura complexa de seqüências genômicas ou de DNA. Para tanto, utilizam-se oligonucleotídeos complementares a regiões flanqueadoras do fragmento do gene ou seqüência-alvo, os chamados iniciadores (*primers*), que na presença ainda de uma DNA polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), de deoxinucleotídeos trifosfatados e de um tampão próprio geram, através da alternância de temperatura, cópias do fragmento do DNA molde compreendido entre os sítios de ligação dos iniciadores.

A elevação da temperatura a 94°C promove a desnaturação do DNA, depois se abaixa a temperatura para 57°C para fazer a ligação (anelamento) dos *iniciadores* à fita molde, depois se eleva para 72°C para extensão da fita molde complementar pela atuação da enzima ao incorporar cada nucleotídeo da nova fita complementar. Ao final de cada ciclo temos duas novas fitas, idênticas em suas seqüências. Como utilizamos pelo menos 35 ciclos, teremos milhões de cópias. Evidentemente que para cada *primer* utilizado estas temperaturas podem variar um pouco, tudo depende da quantidade de nucleotídeos contidos nos iniciadores e as ligações de G-C.

A evidenciação se faz por eletroforese em gel de agarose a 1,6%, ou gel de poliacrilamida. Cora-se com brometo de etídeo e fotodocumenta-se utilizando luz ultravioleta.

Para proceder ao teste de PCR primeiramente foi necessário padronizar a reação, verificando no GenBank Internacional o desenho do DNA do *Trypanosoma cruzi*, e consultando várias bibliografias e trabalhos publicados que tinham esse objetivo.

O *Trypanosoma cruzi* constitui um eucarionte muito complexo, sendo que diversos autores se referem a esse parasito como “complexo *Trypanosoma cruzi*” (COURA, 2005). A primeira dificuldade foi em relação à escolha dos iniciadores. Analisando a literatura foram escolhidos dois iniciadores do DNA genômico do parasito e um iniciador do seu cinetoplasto (tabela 11).

Além do iniciador para *T. cruzi*, foi decidido também testar as amostras e culturas com um iniciador de *T. rangeli*.

As condições de reação para os diversos iniciadores se encontram nas tabelas 12 a 16.

TABELA 11 – SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR

Iniciadores	Seqüências 5'-3'	Referência e Tripanosomatídeo
TCZ1	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT	KIRCHHOFF <i>et al.</i> 1996
TCZ2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	(<i>T. cruzi</i>)
TCZ3	TGCTGCASTCGGCTGATCGTTTTCGA	MARCON <i>et al.</i> 2002
TCZ4	CAR GSTTGTGTTGGTGTCCAGTGTGTTGA	(<i>T. cruzi</i>)
Tc24-T1	GACGGCAAGAACGCCAAGGAC	TAIBI <i>et al.</i> 1995
Tc24-T2	TCACGCGCTCTCCGGCACGTTGTC	(<i>T. cruzi</i>)
R1	CGCGGCTCGCACTGCACCTC	VARGAS <i>et al.</i> 2000
R2	GGCGCATCCACCGAGCACTG	(<i>T. rangeli</i>)

TABELA 12 – PROTOCOLO DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi* USANDO O INICIADOR TCZ1/TCZ2

Reagente	Para 1 Amostra	Condições de Amplificação
Água q.s.p.	25 µL	
Tampão (1X)	2,5 µL	94°C - 5 minutos
Gelatina (0,01%)	0,125 µL	95°C - 1 minuto
MgCl ₂ (1,5mM)	0,75 µL	65 C - 1 minuto
dNTP (200 µM)	2 µL	72°C - 1 minuto
TCZ1 (25 pmoles)	1,25 µL	72°C - 5 minutos
TCZ2 (25 pmoles)	1,25 µL	33 vezes
Taq DNA Polimerase	0,125 µL	
DNA	2 a 8 µL extraídos de sangue de pacientes e 20 ng de DNA de culturas.	

As concentrações para os iniciadores TCZ1/TCZ2, correspondem a 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,01 % de gelatina (MERCK), 200 µM de dNTP, 25 pmoles de cada iniciador e 0,625 U de Taq DNA Polimerase, e 2, 4 e 8 µL de DNA extraído de sangue de pacientes ou 20 ng de cultura , e água ultrapura para completar 25 µL de reação.

TABELA 13 – PROTOCOLO DE PCR PADRONIZADO PARA O INICIADOR R1/R2
ESPECÍFICO PARA *Trypanosoma rangeli*

Reagente	Para 1 Amostra	Condições de Amplificação
Água q.s.p.	25 µL	
Gelatina (0,01%)	0,125 µl	
Tampão (1X)	2,5 µL	94°C - 4 minutos
MgCl ₂ (1mM)	0,5 µL	94°C - 1 min., 65°C-1 min., 72°C-1 min. (2 ciclos)
dNTP (100 µM)	1 µL	94°C-1 min., 65° C - 1 min., 72° C-1 min. (10 ciclos), diminuição de 1°C a cada ciclo.
R1 (12,5 pmoles)	0,625 µL	94°C-1 min., 55°C-1 min., 72° C - 1 min. (18 ciclos)
R2(12,5 pmoles)	0,625 µL	72° C - 5 minutos
<i>Taq</i> DNA Polimerase (1U)	0,2 µL	
DNA	4 µL de DNA extraído de sangue de pacientes 20 ng de DNA de culturas	

Neste protocolo para cada 25 µL de reação foi feito um mix com 10 mM de tampão Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 12,5 pmoles de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 4 µl de DNA extraído de sangue de pacientes ou 20 ng de DNA de culturas e água ultrapura até completar o volume final. Para este par de iniciadores usou-se *touchdown* PCR.

TABELA 14 – PROTOCOLO DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DE
Trypanosoma cruzi COM OS INICIADORES TCZ1/TCZ2
PRIMEIRA REAÇÃO

Reagente	Para 1 Amostra	Condições de Amplificação
Água q.s.p.	25 µL	94°C - 5 minutos
Tampão (1X)	2,5 µL	94°C - 40 segundos
MgCl ₂ (1 mM)	0,5 µL	55°C - 40 segundos
dNTP (200 µM)	2 µL	72°C - 90 segundos
TCZ3 (25 pmoles)	1,25 µL	72°C - 5 minutos
TCZ4 (25 pmoles)	1,25 µL	35 vezes
<i>Taq</i> DNA Polimerase (1U)	0,2 µL	
DNA	20 ng para DNA extraído de cultura	

Para a primeira reação de Nested-PCR, as concentrações correspondem a 10 mM de tampão Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, 25

pmoles de cada iniciador TCZ1 e TCZ2, 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 20 ng de DNA de culturas e água ultrapura até completar o volume final de 25 µL.

Para a segunda reação de Nested-PCR foi utilizado 10 mM de tampão de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 200 µM de dNTP, 25 pmoles de cada iniciador TCZ3 e TCZ4, 2,8 mM de MgCl₂, 1 U de *Taq* DNA Polimerase e 0,6 µL de produto da reação com os iniciadores TCZ1/TCZ2 e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL.

Na PCR com os iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2 foram usadas as seguintes concentrações: 10 mM de tampão Tris-HCl, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTP, 25 pmoles de cada *primer* e 1 U de *Taq* DNA Polimerase, 2, 4 e 8 µL de DNA extraído de pacientes ou 20 ng de DNA de culturas de culturas e água ultrapura até completar um volume final de 25 µL.

TABELA 15 – PROTOCOLO DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* COM OS INICIADORES TCZ3/TCZ4 SEGUNDA REAÇÃO

Reagente	Para 1 Amostra	Condições de Amplificação
Água q.s.p.	25 µL	94°C - 5 minutos
Tampão (1X)	2,5 µL	94°C - 40 segundos
MgCl ₂ (2,8mM)	1,4 µL	55°C - 40 segundos
dNTP (200 µM)	2,0 µL	72°C - 90 segundos
TCZ3 (25 pmoles)	1,25 µL	72°C - 5 minutos
TCZ4 (25 pmoles)	1,25 µL	25 vezes N-PCR
<i>Taq</i> DNA Polimerase (1U)	0,2 µL	
Produto da PCR com os iniciadores TCZ1/TCZ2	0,6 µL da primeira PCR	

TABELA 16 – PROTOCOLO DE PCR PARA DETECÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi* USANDO OS INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2

Reagente	Para 1 amostra	Temperatura	Tempo	Ciclos
Água	15,55 µL	94°C	5 minutos	1
Tampão (1X)	2,5 µL	94 °C	1 minuto	35
MgCl ₂ (2,5 mM)	1,25 µL	60°C	1 minuto	35
dNTP (100 µM)	1 µL	72°C	1 minuto	35
Tc24-T1 (25 pmoles)	1,25 µL	72°C	5 minutos	1
Tc24-T2 (25 pmoles)	1,25 µL	4°C	5 horas	1
<i>Taq</i> DNA Polimerase (1U)	0,2 µL			
DNA	20 ng de culturas			

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em duas etapas. Primeiramente serão dados os resultados dos exames sorológicos e de PCR obtidos com pacientes cardiopatas, portadores de megaesôfago e megacolon e de surto de doença aguda. Em seguida serão apresentados os resultados encontrados para as diversas culturas de *T. cruzi*. Obviamente que para as culturas só foi testado a Reação de Cadeia da Polimerase com seus diversos iniciadores, sendo um teste para cada iniciador específico.

5.1 RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM PACIENTES CHAGÁSICOS

Para o teste de IFI considerou-se positivo quando os parasitos apresentaram fluorescência em toda a membrana, e determinou-se o título considerando a última diluição que apresentou fluorescência (figuras 1 e 2). Primeiramente os pacientes foram avaliados, pela técnica de IFI para pesquisa de anticorpos da classe IgG para verificação de doença pregressa. Dos 77 pacientes analisados para IgG, 23 foram não reagentes, sendo 11 do Ambulatório de Doença de Chagas, 8 do Serviço de Endoscopia Per Oral, 2 do surto de doença aguda e 2 do interior do Estado. Dois pacientes apresentaram sorologia indeterminada, ambos eram procedentes do Ambulatório de Doença de Chagas e encaminhados pelos bancos de sangue como sorologia reagente ou indeterminada. Os outros 52 pacientes tiveram sorologia positiva para IFI IgG em títulos que variaram de 1/40 a 1/2560 (tabela 17).

A pesquisa de anticorpos da classe IgM para verificação de doença aguda foi realizada em todos os pacientes e, apenas três foram sororreagentes (tabela 18) . Estes foram os únicos pacientes que apresentaram resultados de IgM positivos, sendo que os demais eram pacientes com doença crônica.

TABELA 17 – PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG ANTI-*Trypanosoma cruzi* PELA TÉCNICA DE IFI EM PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS, PROCEDENTES DE DIFERENTES LOCAIS DO PARANÁ

Pacientes	NR	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
ADC – M	2	0	3	0	1	2	1	0	0
ADC – F	9	2	2	1	2	4	4	1	0
EPO – M	4	0	0	3	3	1	2	1	1
EPO – F	4	0	0	0	2	5	6	0	1
HC – F	0	0	0	0	0	1	0	0	0
SESA – M	1	0	0	0	0	0	0	1	0
SESA – F	1	0	0	1	0	0	0	0	0
SURTO M	0	0	1	0	0	0	0	0	0
SURTO F	2	0	0	0	2	0	0	0	0
TOTAL	23	2	6	5	10	13	13	3	2

NOTAS: NR = Não Reagente.

ADC = Ambulatório de Doença de Chagas.

EPO = Serviço de Endoscopia Per Oral.

SESA = Secretaria de Saúde.

SURTO = Pacientes atendidos por ocasião do surto de doença de Chagas por via oral ocorrido em Santa Catarina em 2005.

M = Masculino.

F = Feminino.

TABELA 18 – RESULTADO DA PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgM ANTI-*Trypanosoma cruzi* PELA TÉCNICA DE IFI DE PACIENTES NA FASE AGUDA DE DOENÇA DE CHAGAS

Pacientes	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
SURTO – M	0	0	0	0	1
SURTO - F	1	1	0	0	0

NOTAS: SURTO = Pacientes vindos do surto de Santa Catarina e atendidos pelo LACEN – Paraná.

M = Masculino.

F = Feminino.

FIGURA 1 – TESTE DE IFI REAGENTE

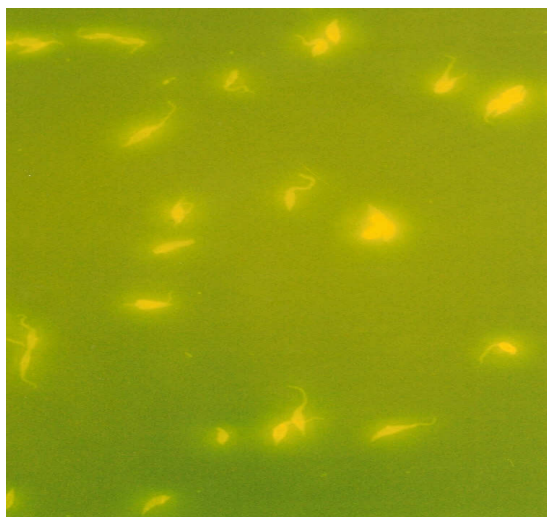
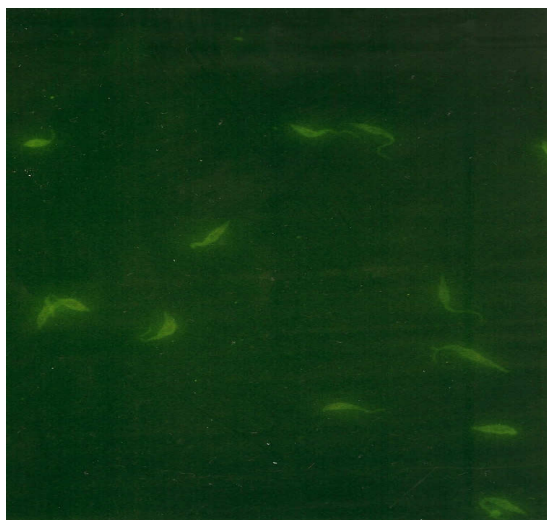


FIGURA 2 – TESTE DE IFI NÃO REAGENTE



5.2 PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG PELO TESTE ELISA NOS PACIENTES CHAGÁSICOS

Considerou-se um teste positivo cujas absorvâncias tenham sido maior que o *cut-off*, negativo os resultados de absorvância inferiores ao *cut-off* e *borderline* os testes com densidade óptica próximo ao *cut-off* da reação.

Dentre os 77 pacientes analisados 51 apresentaram absorvância superior ao ponto de corte da reação, sendo 20 do Ambulatório de Doença de Chagas e 25 do Serviço de Endoscopia Per-Oral, 1 do Serviço de Gastroenterologia, 3 pacientes do surto de doença aguda e 2 pacientes do interior do Estado. Foi constatado também absorvância *borderline* em 7 pacientes, sendo 5 do Ambulatório de Doença de Chagas, e 2 do Serviço de Endoscopia (tabela 19). As amostras que apresentaram resultado negativo ou indeterminado para o Ambulatório de Doença de Chagas foram provenientes do banco de sangue do Hospital de Clínicas cujos resultados foram *borderline* para a sorologia e as bolsas foram descartadas para a doação. Posteriormente estes doadores foram encaminhados para o Ambulatório de doença de Chagas para confirmar ou não a suspeita da doença, porém, sem doença aparente. Os pacientes não reagentes foram 19, sendo 9 do Ambulatório de Doença de Chagas, desses, 8 não tinham epidemiologia para a doença e 1 era filho de mãe chagásica. No Serviço de Endoscopia Per Oral foram 6 pacientes negativos com megaesôfago de causa desconhecida e que não possuem epidemiologia para

doença de Chagas. Dentre os negativos cabe alertar que dois pacientes com IgM baixo (1/40 e 1/80 no IFI), tiveram ELISA negativo e o paciente com título alto de IgM (1/640), teve seu resultado de ELISA com índice de absorbância mais baixo em relação ao grupo de doença crônica.

TABELA 19 – RESULTADO DA PESQUISA DE ANTICORPOS DA CLASSE IgG ANTI-*Trypanosoma cruzi* PELO TESTE IMUNOENZIMÁTICO

Pacientes	Reagente	Não Reagente	Indeterminado
ADC – M	6	2	1
ADC – F	14	7	4
EPO – M	11	2	2
EPO – F	14	4	0
SESA – M	1	1	0
SESA – F	1	1	0
HC – F	1	0	0
SURTO – M	1	0	0
SURTO – F	2	2	0
TOTAL	51	19	7

NOTAS: ADC = Ambulatório de Doença de Chagas.

EPO = Serviço de Endoscopia Per-Oral do Hospital de Clínicas.

SESA = Secretaria de Saúde, são pacientes da rede SUS atendidos pelo LACEN – PR.

M = Masculino.

F = Feminino.

5.3 RESULTADOS DA HEMOCULTURA NOS PACIENTES PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS

No total foram isoladas cinco cepas de *Trypanosoma cruzi* de pacientes. Os resultados da hemocultura para os pacientes se encontram na tabela 20. Todos os pacientes que tiveram *T. cruzi* isolados em hemocultura tiveram sorologia positiva quer seja pelo método de IFI e ELISA.

Dois pacientes, do Serviço de Endoscopia Per-Oral, apresentavam acesso venoso difícil e não tiveram o sangue colhido para a realização da hemocultura, apesar de terem sorologia e epidemiologia positivas para doença de Chagas. Pacientes cujas sorologias foram negativas e não tinham epidemiologia para doença de Chagas também não foram realizadas as hemoculturas. No total foram 58 hemoculturas negativas, 5 positivas, e 14 não realizadas.

TABELA 20 – RESULTADOS DAS HEMOCULTURAS REALIZADAS EM PACIENTES COM SUSPEITA DE DOENÇA DE CHAGAS

Pacientes	Positiva	Negativa	Não Realizado
ADC – M	0	7	2
ADC – F	2	17	6
EPO – M	0	13	2
EPO – F	1	13	4
SESA – M	0	2	0
SESA – F	0	2	0
HC – F	1	0	0
SURTO – M	1	0	0
SURTO – F	0	4	0
TOTAL	5	58	14

NOTAS: ADC = Ambulatório de Doença de Chagas.

EPO = Serviço de Endoscopia Per-Oral do Hospital de Clínicas.

SESA = Secretaria de Saúde. São pacientes da rede SUS atendidos pelo LACEN – PR.

M = Masculino.

F = Feminino.

5.4 RESULTADOS DOS TESTES DE PCR

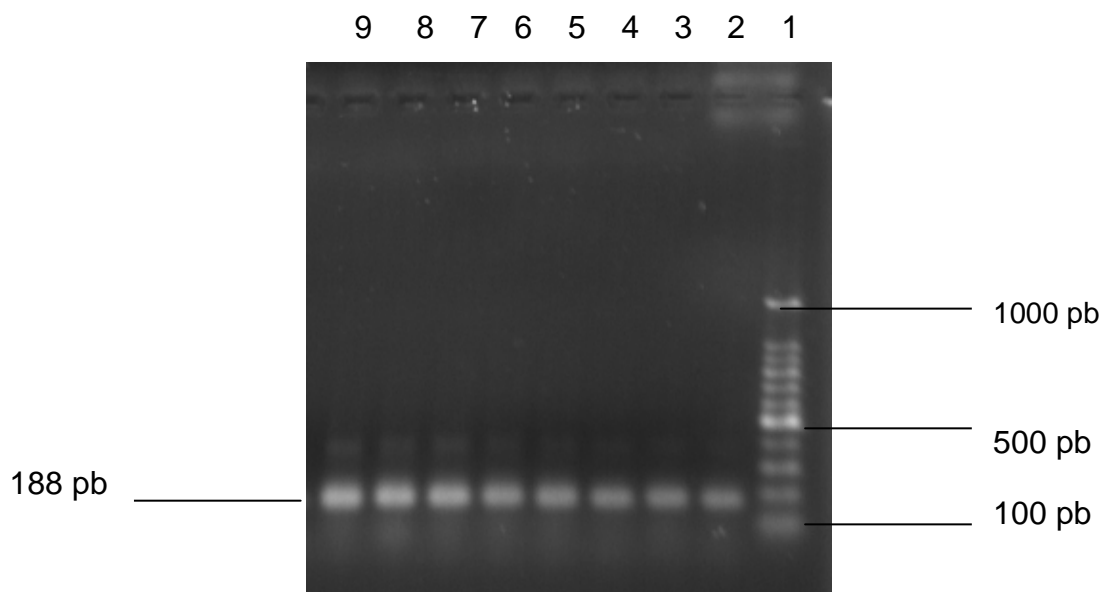
Para proceder a técnica de PCR primeiramente foi necessário padronizar a reação usando amostra positiva de cultura. Este procedimento foi realizado para os diversos iniciadores para *T. cruzi* (TCZ1/TCZ2, TCZ3/TCZ4 e Tc24-T1/Tc24-T2) e para *T. rangeli* (R1/R2).

5.4.1 Teste de Sensibilidade com os Iniciadores TCZ1/TCZ2

A sensibilidade da reação foi feita com um sangue verdadeiramente negativo que foi contaminado com uma cultura de *T. cruzi* diluindo-se em: 1 parasito no tubo 1 com amostra de sangue (verdadeiramente negativo), 5 parasitos no tubo 2; 10 parasitos no tubo 3; 50 parasitos no tubo 4; 100 parasitos no tubo 5; 150 parasitos no tubo 6; 300 parasitos no tubo 7 e 600 parasitos no tubo 8.

Em todas as diluições houve amplificação do fragmento gênico esperado com 188 pb (figura 5), portanto a técnica mostrou-se sensível para detectar um único parasito.

FIGURA 3 – TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES TCZ1/TCZ2 PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi*

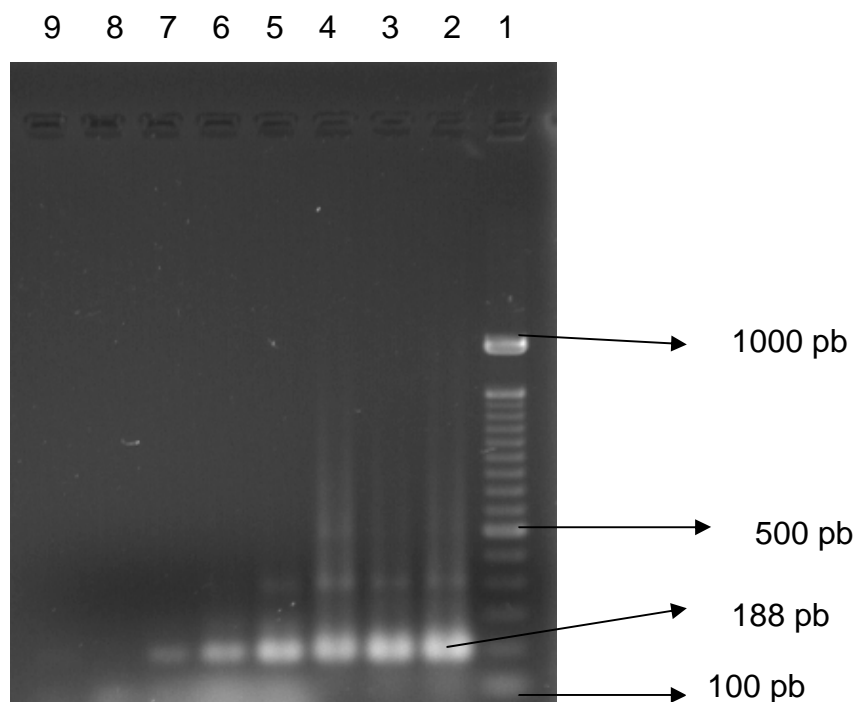


Linha: 1 – Padrão de peso molecular 100 pb; Linhas de 2 a 9 DNA de *T. cruzi* em diferentes concentrações. 2 – 1 parasito; 3- 5 parasitos; 4- 10 parasitos; 5 - 50 parasitos; 6 – 100 parasitos; 7 – 150 parasitos; 8 – 300 parasitos; 9 – 600 parasitos.

5.4.2 Resultado de Especificidade da PCR com os Iniciadores TCZ1/TCZ2

Para estabelecer a especificidade dos iniciadores (TCZ1/TCZ2) foram avaliadas culturas de *T. cruzi*, duas culturas de *Leishmania braziliensis* (uma vez que essa tem maior distribuição geográfica no Brasil), uma cultura de *L. amazonensis* e duas culturas de *Trypanosoma rangeli*. Todos os DNAs dessas culturas foram submetidos sob as mesmas condições e mesmo padrão de amplificação para comparar a especificidade. Após amplificação e eletroforese verificou-se que todas as amostras de *T. cruzi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *T. rangeli* apresentaram fragmentos de 188 pb (figura 6), ou seja, não foram específicos para *T. cruzi* como o esperado.

FIGURA 4 – TESTE DE ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES TCZ1/TCZ2 PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE *Trypanosoma cruzi* POR PCR



Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – Cepa referência de *T. cruzi* 152 y; 3- HC 45 (*T. cruzi* isolado de humano); 4- *T. rangeli* (cepa CHOACHI); 5 – *T. rangeli* (SC 58); 6- CUR 22 (*L. braziliensis*); 7- LEM 690 (*L. amazonensis*); 8- Controle negativo (água).; 9 – Controle negativo sangue humano negativo para *T. cruzi*.

5.4.3 Resultado dos Iniciadores TCZ1/TCZ2 para Pesquisa de DNA de *T. CRUZI* em Sangue de Pacientes e Cepas Isoladas em Culturas

Uma vez estabelecida a sensibilidade e a especificidade da reação de PCR, com os iniciadores TCZ1/TCZ2, todos os pacientes com suspeita de doença de Chagas crônica e aguda cujas sorologias foram positivas ou duvidosas tiveram sangue colhido e submetidos à técnica de PCR. Em todos os pacientes com doença crônica do Ambulatório de doença de Chagas, foi observada a amplificação de fragmento de 188 pb inclusive em dois pacientes com sorologia *borderline* e epidemiologia positiva. Porém, um paciente sorologicamente positivo e com epidemiologia para a doença de Chagas, o resultado do teste de PCR foi negativo.

Nos pacientes do ambulatório de endoscopia per-oral, só um deles com doença crônica foi negativo ao teste PCR com TCZ1/TCZ2. Esse paciente fez uso,

na época do descobrimento de sua doença, do medicamento Rochagan® que é um antiparasitário conhecido no mercado contra o *T. cruzi*; e, dois pacientes com sorologias duvidosas foram negativos para o teste de PCR, sendo esses pacientes sem epidemiologia para a doença de Chagas.

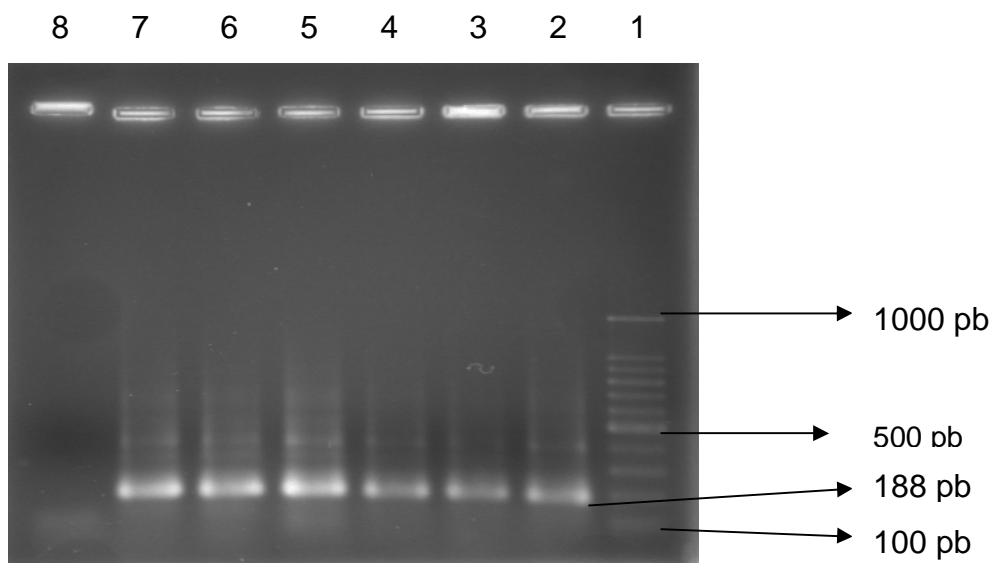
Analisando a concordância entre a PCR para iniciadores TCZ1/TCZ2 e a sorologia dos pacientes, houve 95,23% de concordância e, se analisarmos a correlação entre epidemiologia positiva e o exame de PCR a concordância sobe para 95,8%, uma vez que a PCR foi capaz de detectar dois pacientes com sorologia duvidosa e epidemiologia compatível com a doença de Chagas.

Para todas as 28 culturas de *T. cruzi* isoladas de triatomíneos, reservatórios e humanos a PCR foi positiva com iniciadores TCZ1/TCZ2 e a amplificação de algumas dessas culturas pode ser observada na figura 5.

Os resultados consolidados de sorologia, cultura e PCR com dois iniciadores estão registrados nas tabelas 22 a 26.

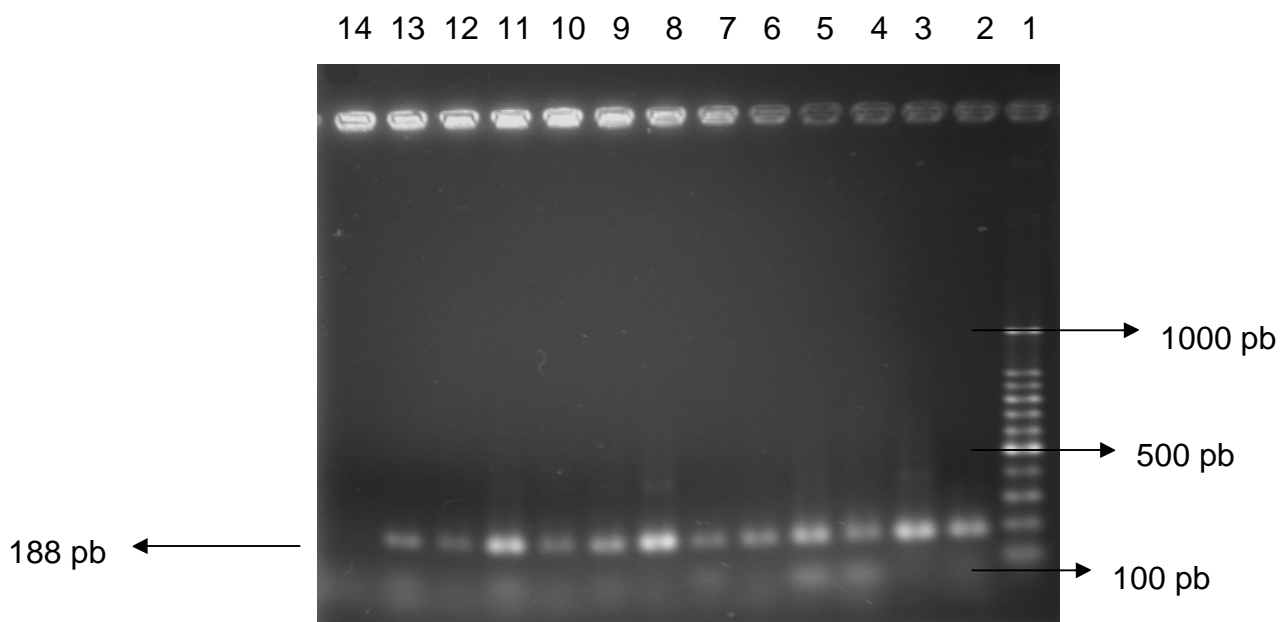
Os pacientes do Ambulatório de Doença de Chagas que não foram realizados o teste de PCR, foram encaminhados por bancos de sangue com sorologia *borderline*, porém, em nosso laboratório foram não reagentes e tinham epidemiologia negativa. No Serviço de Endoscopia Per-Oral, dois pacientes positivos sorologicamente (1 masculino e 1 feminino), não foi conseguido coletar amostra de sangue tanto para cultura quanto para PCR porque tinham o acesso venoso muito difícil, e 6 pacientes tiveram a sorologia negativa e epidemiologia também negativa e não foi realizado o teste de PCR.

FIGURA 5 – TÉCNICA DE PCR USANDO INICIADORES TCZ1/TCZ2 COM AMOSTRAS VERDADEIRAMENTE POSITIVAS



1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – CUR 70; 3 – CUR 98; 4 – CUR 105; CUR 106; CUR 107; CUR 116; 8 – Controle negativo.

FIGURA 6 – PCR REALIZADOS EM PACIENTES POSITIVOS PARA DOENÇA DE CHAGAS COM INICIADORES TCZ1/TCZ2



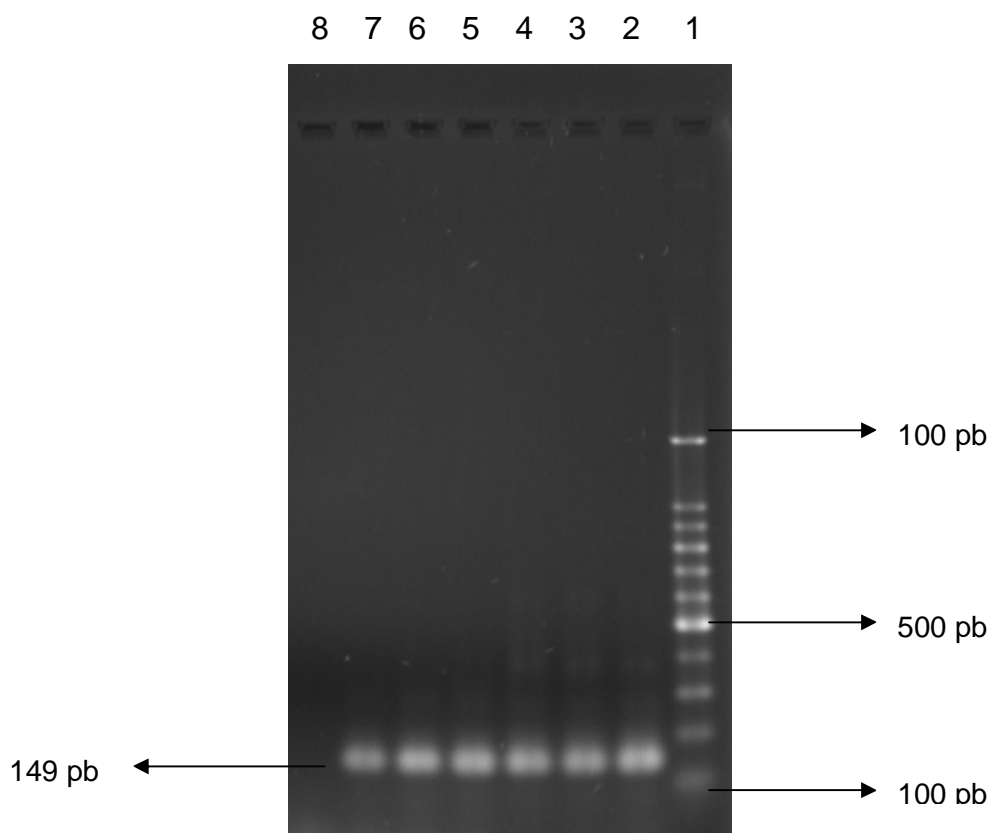
1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – J. (paciente agudo); 3 – N doença crônica; 4 – M.paciente com megaesôfago; E. (assintomático); 6 – M.L. (cardiopatia); 7 – I.(cardiopatia); 8 –P. (cardiopatia); 9 – N.D. (megaesôfago).10 – G. (megaesôfago). 11 – A. cardiopatia; 12 – T. (megaesôfago); 13 –R. (cardiopatia); 14 – Controle negativo.

5.4.4 Especificidade dos Iniciadores TCZ3/TCZ4

Segundo a técnica apresentada no trabalho de Marcon *et al.*, (2002) a técnica de Nested-PCR é importante para pacientes que foram transplantados e tomam drogas imunossupressoras para impedirem alguma reação contra o órgão transplantado, o que torna a técnica mais específica. No presente trabalho o primeiro produto de amplificação foi obtido com os iniciadores TCZ1/TCZ2, e em seguida realizada a segunda PCR com os iniciadores TCZ3/TCZ4 (figuras 7 e 8).

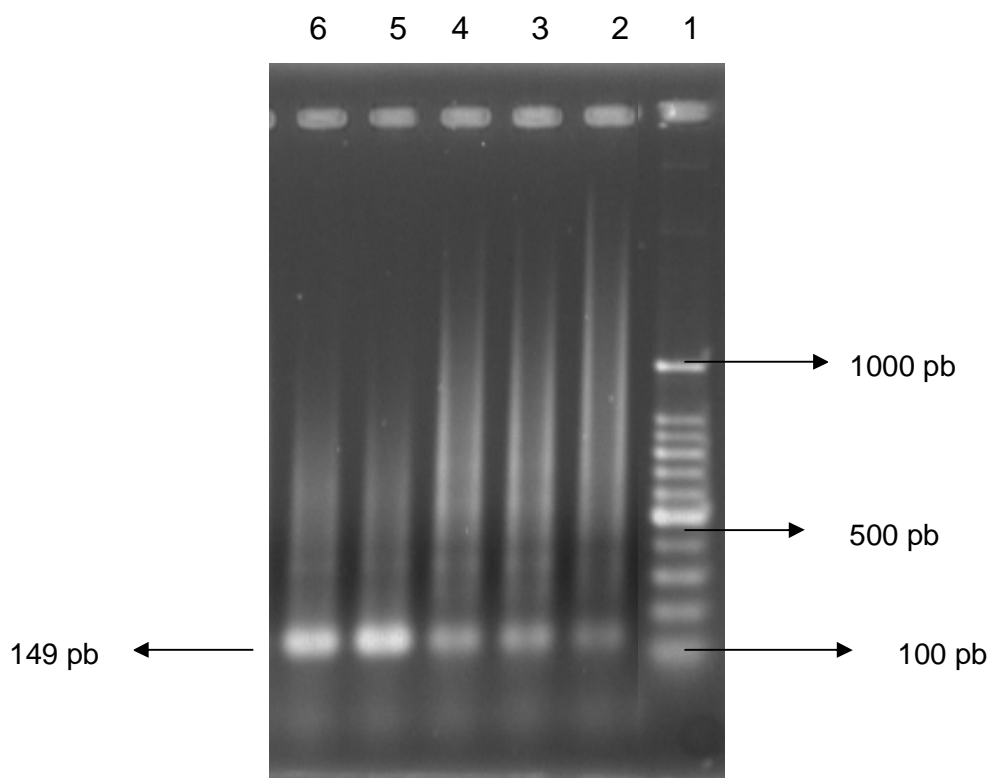
A avaliação da especificidade mostrou resultados semelhantes aos iniciadores TCZ1/TCZ2, ou seja, foi positivo para todas as culturas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e as culturas de *Leishmania* sp. Em função dos resultados obtidos não foi realizada a pesquisa de DNA em amostras de cultura e de pacientes.

FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE PARA OS INICIADORES TCZ3/TCZ4



1 – Padrão de Peso molecular 100 pb; 2 – HC 10 (*T. cruzi*); 3 – HC 43 (*T. cruzi*); 4 – *T. rangeli* SC 58; 5 – *T. rangeli* CHOACHI; 6 – CUR 22 (*L. braziliensis*); 7 – LEM 690 (*L. amazonensis*); 8 – controle negativo (água). Os produtos considerados positivos têm 188 pb.

FIGURA 8 – TESTE DE NESTED-PCR

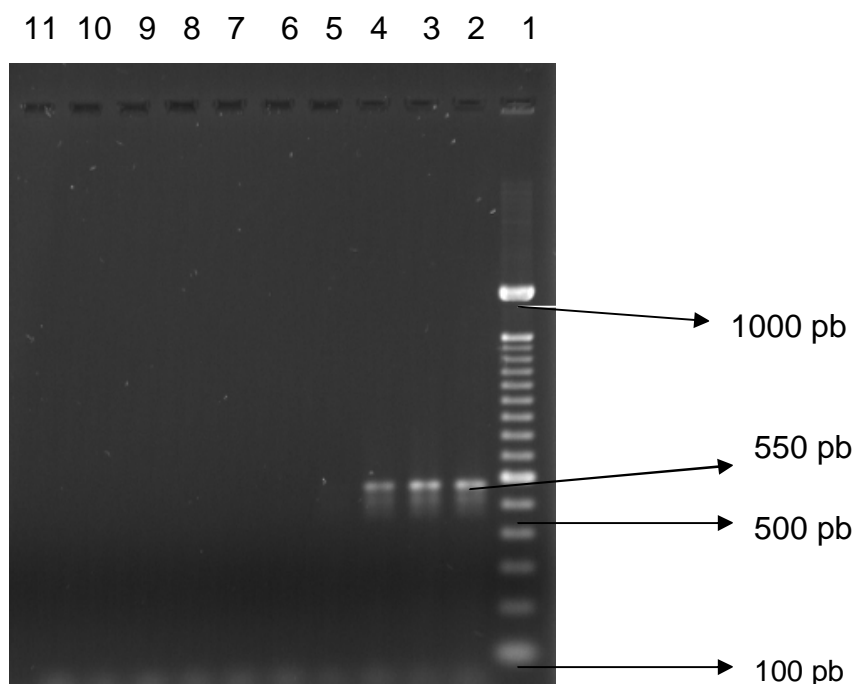


1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – CUR 70 (*T. cruzi*); 3 – CHOACHI (*T. rangeli*); 4 – SC 58 (*T. rangeli*); 5 – LEM 690 (*L. amazonensis*); 6 – CUR 22 (*L. braziliensis*). Produtos com 149 pb.

5.4.5 Teste de Sensibilidade com os Iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2

A avaliação da sensibilidade com os iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2 foi feita semelhante aos iniciadores TCZ1/TCZ2. Todavia, as amostras de sangue contaminadas artificialmente se mostraram negativas, sendo repetidas várias vezes e em todas confirmando o resultado. Nova tentativa foi realizada visando melhorar a sensibilidade usando desta vez a diluição do DNA de cultura pura de *T. cruzi* com água ultrapura para Biologia Molecular, com títulos conhecidos de 20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg e 1 fg. O resultado foi uma sensibilidade de até 1 ng de diluição conforme pode ser visto na figura 9.

FIGURA 9 – TESTE DE SENSIBILIDADE DOS INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2



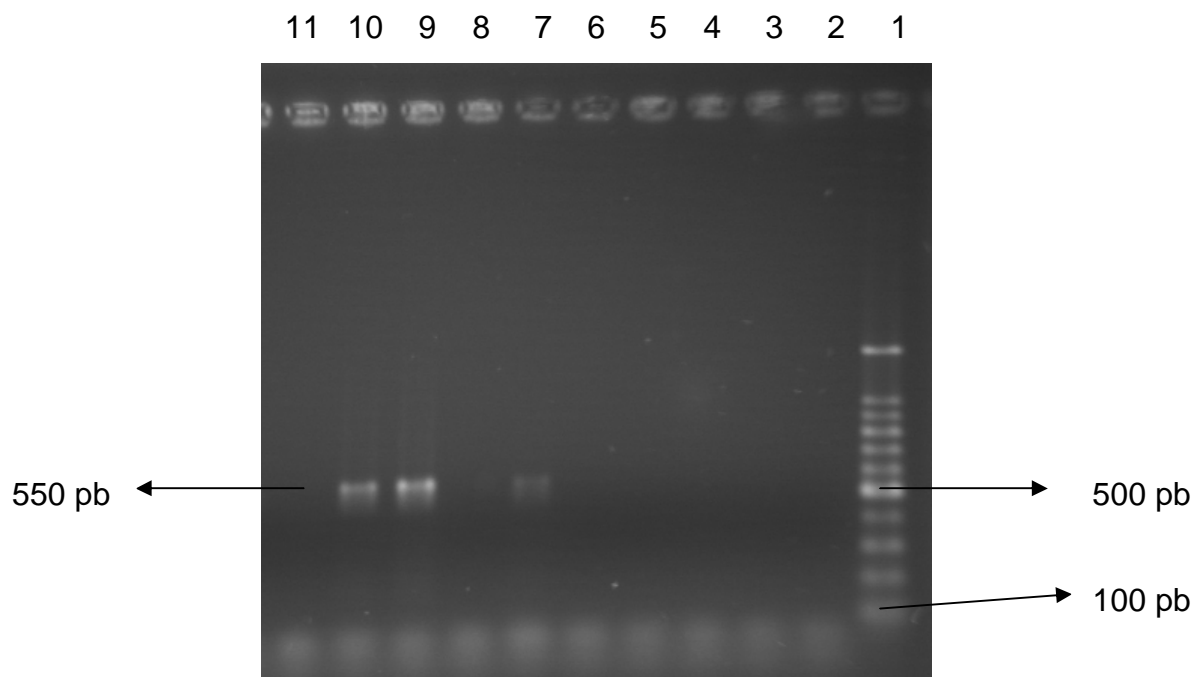
1 – Padrão de peso molecular; 2 – cultura 20 ng; 3 – cultura 10 ng; 4 – cultura 1 ng; 5 – cultura 100 pg; 6 – cultura 10 pg; 7 – cultura 1 pg; 8 – cultura 100 fg; 9 – cultura 10 fg; 10 – cultura 1 fg; 11 – controle negativo (água). Os testes positivos têm 550 pb.

As tentativas de amplificação de fragmento de DNA específico para *T. cruzi* em amostras de sangue foram negativas, mas com DNA extraído do protozoário obtido em cultura pura o teste de PCR, com esses iniciadores, logrou êxito.

5.4.6 Resultado de Especificidade com os Iniciadores Tc24-T1 e Tc24-T2

Para se testar a especificidade foi feita a amplificação com esses iniciadores em culturas de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *Leishmania* sp. Os iniciadores não amplificaram DNA de *T. rangeli* e *L. amazonensis*, mas amplificaram DNA de uma das cepas de *L. braziliensis* (CUR 78) (figuras 10 e 11). Duas culturas de *T. cruzi* de 5 testadas nesse experimento se apresentaram negativas, o que não ocorreu com os iniciadores anteriormente estudados (figura 10).

FIGURA 10 – TESTE DE ESPECIFICIDADE PARA PCR COM INICIADORES Tc24-T1/Tc24-T2

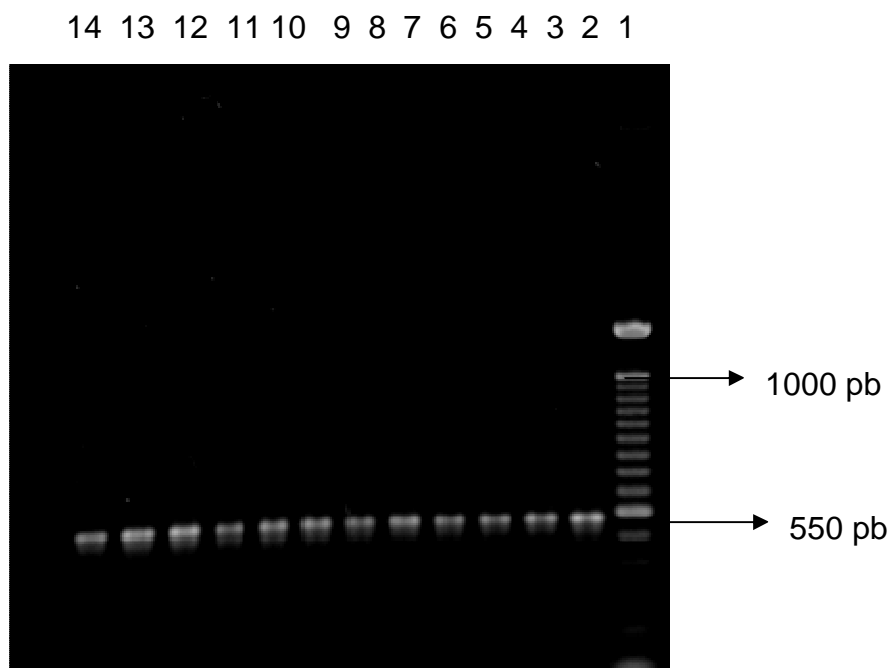


1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – SC 58 (*T. rangeli*); 3 – CHOACHI *T. rangeli*; 4 – CUR 22 *L. braziliensis*; 5 – LEM 690 *L. amazonensis*; 6 – CUR 108 *T. cruzi*; 7 – HC 43 *T. cruzi*; 8 – CUR 115 *T. cruzi*; 9 – HC 27 *T. cruzi*; 10 – CUR 309 *T. cruzi*; 11 – controle negativo. Os testes positivos têm 550 pb.

5.4.7 Resultado do Teste PCR com os Iniciadores Tc24-T1 e Tc24-T2 com as Culturas de *T. cruzi* do Trabalho

Para as culturas de *T. cruzi* esses iniciadores foram positivos, com exceção de duas culturas isoladas de triatomíneos e reservatórios, as amostras de culturas de *T. cruzi* isoladas de humanos 6 foram positivas e 1 foi negativa. A sensibilidade da reação foi de 89,3%, sendo padronizada quantidade de 20 ng de DNA da cultura para fazer o teste. A visualização da PCR com esses iniciadores esta documentada na figura 11.

FIGURA 11 – REAÇÃO DE PCR COM OS INICIADORES Tc24T1/Tc24-T2 EM VÁRIAS CULTURAS

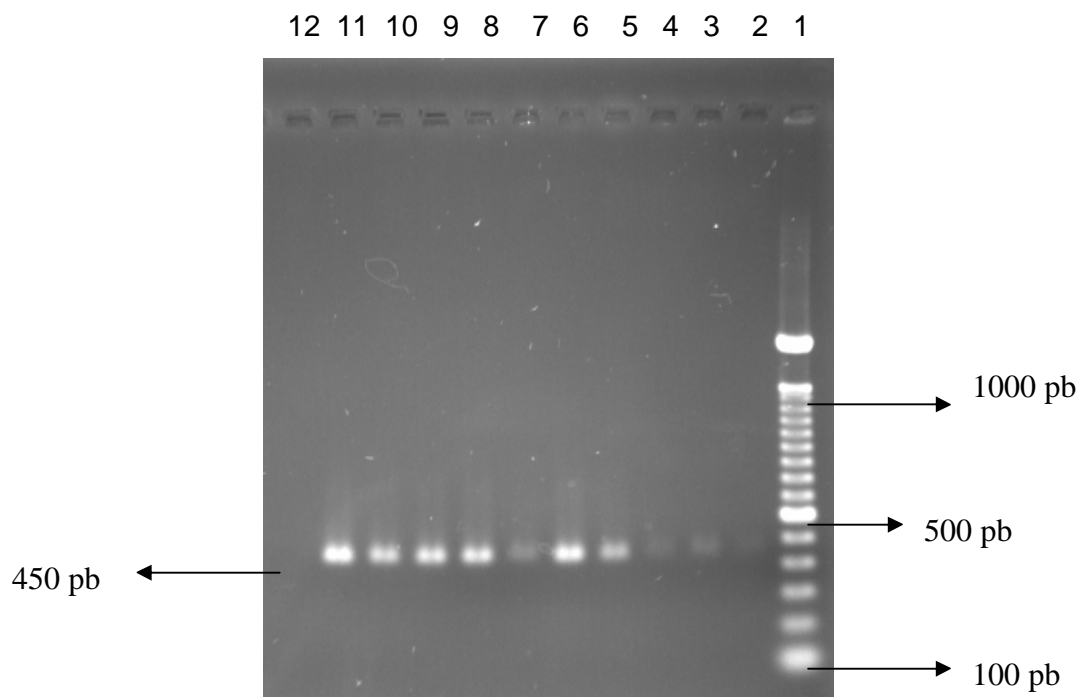


1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – *T. cruzi* (HC 45); *T. cruzi* (CUR 70); 3 – *T. cruzi* (CUR 70); 4 – *L. braziliensis* (CUR 78); 5 – *T. cruzi* (CUR 89); 6 – *T. cruzi* (CUR 90); 7 – *T. cruzi* (CUR 93); 8 – *T. cruzi* (CUR 96); 9 – *T. cruzi* (CUR 97); 10 – *T. cruzi* (CUR 98); 11 – *T. cruzi* (CUR 99); 12 – *T. cruzi* (CUR 100); 13 – *T. cruzi* (CUR 101); 14 – controle negativo (água). Os testes considerados positivos com 550 pb.

5.4.8 Resultado do Teste de Sensibilidade com os Iniciadores R1/R2 para *T. rangeli*

Para se testar a sensibilidade com os iniciadores R1/R2 foi contaminado um sangue (negativo) humano com *T. rangeli*, da cultura CHOACHI com 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 670 parasitos por tubo de sangue, conforme o protocolo anteriormente descrito para os iniciadores TCZ1/TCZ2. Os DNAs foram extraídos conforme protocolo anterior e a amplificação foi realizada cujos resultados também se mostraram altamente sensíveis sendo positivo para apenas um parasito, o que ficou demonstrado na figura 12.

FIGURA 12 – TESTE DE SENSIBILIDADE DA REAÇÃO DE PCR COM OS INICIADORES R1/R2



1 – Padrão de peso molecular 100 pb; 2 – 1 parasito; 3 – 5 parasitos; 4 – 10 parasitos; 5 – 50 parasitos; 6 – 100 parasitos; 7 – 150 parasitos; 8 – 200 parasitos; 9 – 250 parasitos; 10 – 300 parasitos; 11 – 670 parasitos; 12 – controle negativo. Os testes positivos com 450 pb.

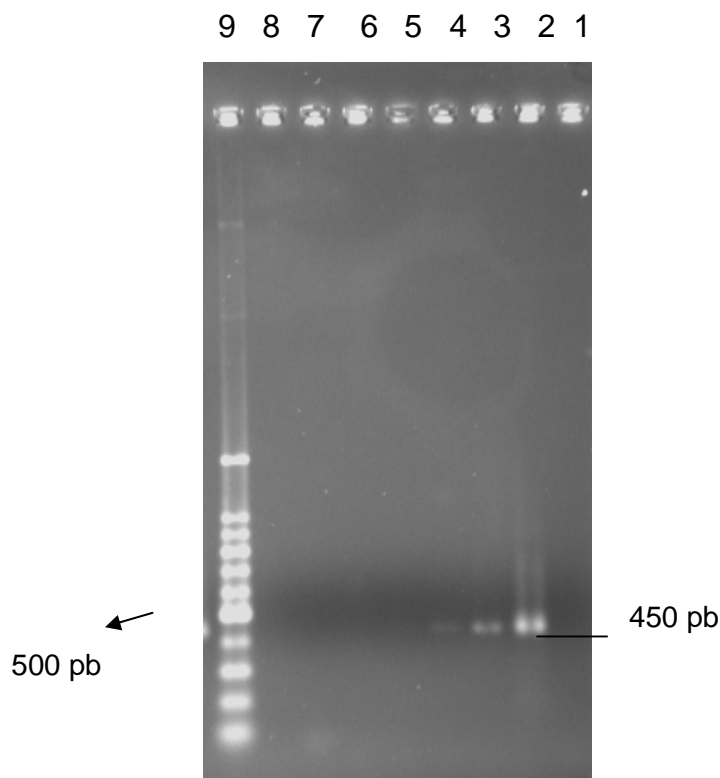
5.4.9 Resultado do Teste de Especificidade dos Iniciadores R1/R2

Para proceder-se o teste de especificidade dos iniciadores R1/R2, foram feitas amplificações com culturas de tripanossomatídeos diversos (*T. rangeli*, *Leishmania* e *T. cruzi*), e foram feitas as corridas em gel de agarose 1,6 %. A especificidade foi muito boa, só uma cultura de *L. amazonensis* foi positiva para esses iniciadores, porém o sinal de amplificação foi fraco. Como se esperava, as culturas de *T. rangeli* foram positivas para esses iniciadores e as de *T. cruzi* foram todas negativas. As amostras de sangue dos pacientes não tiveram o mesmo problema observado com os iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2, ou seja, não tiveram nenhum problema de inibição da reação com componentes do sangue. O teste de especificidade está representado na figura 13.

O sangue de todos os pacientes e as culturas de *T. cruzi* foram passados pelos iniciadores R1/R2 e nenhum paciente demonstrou ser positivo para *T. rangeli*,

e somente as culturas de *T. rangeli* e uma de *Leishmania amazonensis* foram positivas para esses iniciadores (resultados não demonstrados por figuras).

FIGURA 13 – TESTE DE ESPECIFICIDADE DOS INICIADORES R1/R2



1 – Controle negativo; 2 – *T. rangeli* CHOACHI; 3 – *T. rangeli* SC 58; 4 – *L. amazonensis* (LEM 690); 5 – *L. braziliensis* (CUR 22); 6 – *T. cruzi* (cepa referência 152 Y); 7 – *T. cruzi* HC 10; 8 – *T. cruzi* HC 43; 9 – padrão de peso molecular 100 pb. Os testes positivos possuem 450 pb.

5.4.10 Resultados da PCR para Culturas de *T. cruzi* Isoladas de Humanos, Reservatórios e Vetores com os Iniciadores TCZ1/TCZ2, R1/R2 E Tc24-T1/Tc24-T2

Por estes resultados fica demonstrado que os iniciadores TCZ1/TCZ2, tem maior sensibilidade que os iniciadores Tc24-T1/Tc24-T2, mas estes últimos iniciadores são mais específicos. Também para *T. rangeli*, os iniciadores R1/R2 são muito sensíveis e específicos, nenhuma cultura de *T. cruzi* teve reação cruzada com *T. rangeli*, somente as duas culturas de *T. rangeli* usadas como padrão e uma de *L. amazonensis* para testar a especificidade foram positivas com esses iniciadores. O

resultado da PCR para culturas de *T. cruzi* com os diversos iniciadores está representado na tabela 21.

TABELA 21 – RESULTADOS DAS AMPLIFICAÇÕES DO DNA DE *Trypanosoma cruzi* ISOLADOS EM CULTURAS UTILIZANDO OS DIVERSOS INICIADORES

Código da cepa	Iniciadores		
	TCZ1/TCZ2	Tc24T1/Tc24T2	R1/R2
CUR 70	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 89	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 90	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 93	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 96	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 97	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 98	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 99	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 100	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 101	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 104	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 105	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 106	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 107	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 108	Positivo	Negativo	Negativo
CUR 115	Positivo	Negativo	Negativo
CUR 116	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 138	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 139	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 143	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 146	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 162	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 163	Positivo	Negativo	Negativo
CUR 164	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 165	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 167	Positivo	Positivo	Negativo
CUR 307	Positivo	Positivo	Negativo
CUR NAZ	Positivo	Positivo	Negativo

5.4.11 Resultados das Diferentes Metodologias Usadas para o Diagnóstico de Doença de Chagas em Pacientes Selecionados em Comparação com a Epidemiologia

Os resultados para os pacientes do serviço de endoscopia Per-Oral estão apresentados na tabela 22.

TABELA 22 – RESULTADOS DOS PACIENTES DO SERVIÇO DE ENDOSCOPIA PER-ORAL

Nº do Paciente	Idade	Sexo	IFI IgG	IFI IgM	ELISA	CULTURA	TCZ1/TCZ2	R1/R2	Epidemiologia
730	61	M	NR	NR	NR	NEGATIVA	-----	-----	NÃO
734	36	F	NR	NR	NR	NEGATIVA	-----	-----	NÃO
735	71	M	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
766	48	F	1/160	NR	REAG	POSITIVA	POS	NEG	SIM
767	50	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	NEG	NEG	SIM
779	69	M	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
780	70	F	1/640	NR	REAG	-----	-----	-----	SIM
852	59	M	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
853	78	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
854	63	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
882	66	M	1/80	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
883	72	M	1/80	NR	REAG	-----	-----	-----	SIM
884	69	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
945	47	F	1/2560	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
996	57	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
997	64	M	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
998	62	M	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
999	51	M	1/1280	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1000	64	M	1/2560	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1065	63	M	NR	NR	NR	-----	-----	-----	NÃO
1134	55	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1135	56	F	NR	NR	NR	-----	-----	-----	NÃO
1136	52	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1168	41	F	NR	NR	NR	-----	-----	-----	NÃO
1169	56	M	1/80	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1260	51	F	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1261	46	M	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1443	73	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1444	75	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1481	88	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1507	57	M	NR	NR	INDET	NEGATIVA	NEG	NEG	NÃO
1508	27	F	NR	NR	NR	-----	-----	-----	NÃO
456/07	56	M	NR	NR	INDET	NEGATIVA	NEG	NEG	NÃO
TOTAL	33	33	33	33	33	27	25	25	33

NOTA: Os resultados que apresentam o símbolo ----- não foram realizados.

Para os pacientes do serviço do Ambulatório de Doença de Chagas do HC verificou-se que nove não tinham dados epidemiológicos para doença de Chagas. Isto se deveu àqueles pacientes que tiveram sorologia positiva em bancos de sangue. Este e os demais dados estão na tabela 23.

TABELA 23 – RESULTADOS DE SOROLOGIA, CULTURA, PCR (TCZ1/TCZ2 E R1/R2) DOS PACIENTES DO AMBULATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS (HC)

Nº do Paciente	Idade	Sexo	IFI IgG	IFI IgM	ELISA	CULTURA	TCZ1/TCZ2	R1/R2	Epidemiologia
520	45	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS.	NEG	SIM
521	52	M	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
522	54	F	1/80	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
523	37	M	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
524	67	M	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
525	68	F	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
661	61	F	NR	NR	INDET	NEGATIVA	NEG	NEG	NÃO
679	48	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
680	59	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
732	61	F	1/320	NR	REAG	POSITIVA	POS	NEG	SIM
765	58	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
768	54	M	1/40	NR	INDET	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
769	39	F	1/160	NR	REAG	POSITIVA	POS	NEG	SIM
770	72	F	1/1280	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
771	35	F	NR	NR	NR	-----	----	----	SIM
923	50	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
924	64	M	1/610	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1071	41	F	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
1146	52	F	1/40	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1347	63	M	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
1445	50	F	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
1530	50	F	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
1586	19	F	1/320	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	INDET
1644	41	F	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
1649	50	F	1/20	NR	INDET	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1809	62	F	1/40	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1832	66	M	1/40	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
1833	61	F	1/640	NR	REAG	NEGATIVA	NEG	NEG	SIM
80/07	55	F	NR	NR	INDET	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
254/07	52	M	1/40	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
378/07	50	F	NR	NR	INDET	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
432/07	63	F	1/20	NR	NR	NEGATIVA	NEG	NEG	NÃO
500/07	43	F	NR	NR	NR	-----	----	----	NÃO
501/07	53	M	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
TOTAL	34	34-	34	34	34	26	26	26	34

NOTA: Os resultados que apresentam o símbolo ----- não foram realizados.

TABELA 24 – RESULTADOS DE EXAMES SOROLÓGICOS, CULTURA, PCR E EPIDEMIOLÓGICOS DOS PACIENTES PROVENIENTES DO SURTO DE DOENÇA DE CHAGAS OCORRIDO EM FEVEREIRO DE 2005

Nº do Paciente	Idade	Sexo	IFI IgG	IFI IgM	ELISA	CULTURA	TCZ1/TCZ2	R1/R2	Epidemiologia
1	33	M	1/40	1/640	INDET	POSITIVA	POS	NEG	SIM
2	22	F	NR	1/80	NR	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
3	56	F	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
4	22	F	NR	1/40	NR	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
5	50	F	1/160	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
TOTAL	5	5	5	5	5	5	5	5	5

No total foram analisadas sorologicamente (IgG e IgM) 7.000 amostras de pessoas residindo no Paraná mas que visitaram o litoral Catarinense durante o surto de doença de Chagas durante o mês de fevereiro de 2005. Destes foram selecionados para o estudo três pacientes que tiveram IgM positivo e mais dois pacientes que foram diagnosticados com doença crônica.

TABELA 25 – RESULTADOS DE EXAMES SOROLÓGICOS, CULTURA, PCR E EPIDEMIOLÓGICOS DE PACIENTES PROVENIENTES DO INTERIOR DO ESTADO DO PARANÁ CUJAS MORADIAS FORAM ENCONTRADAS TRIATOMÍNEOS CONTAMINADOS POR *T.cruzi*

Nº do Paciente	Idade	Sexo	IFI IgG	IFI IgM	ELISA	CULTURA	TCZ1/TCZ2	R1/R2	Epidemiologia
111	31	F	1/80	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
365	17	M	1/1280	NR	REAG	NEGATIVA	POS	NEG	SIM
366	10	M	NR	NR	NR	NEGATIVA	NEG	NEG	SIM
367	41	F	NR	NR	NR	NEGATIVA	NEG	NEG	SIM
TOTAL	4	4	4	4	4	4	4	4	4

Quanto aos pacientes em que foram encontrados triatomíneos no peridomicílio (espécie não enviada para identificação) e encaminhados para diagnóstico no LACEN verificou-se que o paciente proveniente de Cambé (no. 111) 17^a. Regional do Estado foi positivo e em três pacientes da 8^a. Regional (Planalto) verificou-se que um foi positivo.

Uma única paciente veio do serviço de gastroenterologia do Hospital de clínicas da Universidade Federal do Paraná que tinha megacolon e todos os resultados estão na tabela 26.

TABELA 26 – RESULTADO DO PACIENTE DO SERVIÇO DE GASTROENTEROLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS COM MEGACOLON

Nº do Paciente	Idade	Sexo	IFI IgG	IFI IgM	ELISA	CULTURA	TCZ1/TCZ2	R1/R2	Epidemiologia
6	34	F	1/320	NR	REAG	POSITIVA	POS	NEG	SIM
TOTAL	1	1	1	1	1	1	1	1	1

5.12 ESTUDO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO DE PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Para determinar a sensibilidade dos métodos laboratoriais usados para o diagnóstico de doença de Chagas foram levados em consideração dados de 51 pacientes que tiveram todos os exames (IFI, ELISA e PCR) realizados, e eram procedentes de diferentes localidades e serviços. Como padrão ouro foi considerado dados de epidemiologia e sorologia positivos. A sensibilidade da PCR foi de 96,1% (tabela 27).

TABELA 27 – SENSIBILIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DE DOENÇA DE CHAGAS POR PCR

Grupo de Pacientes	Verdadeiramente Positivos	Falsos Negativos	Total
Serviço de Endoscopia Per-Oral	22	1	23
Ambulatório Doença de Chagas	19	1	20
Surto	5	0	5
Interior do Estado do Paraná	2	0	2
Serviço de Gastroenterologia	1	0	1
Total	49	2	51

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho procurou-se avaliar diferentes métodos sorológicos e moleculares para confirmação da doença de Chagas. Para os pacientes do Ambulatório de Doença de Chagas a percentagem de positividade no teste ELISA foi de 58,8%, e para IFI foi de 61,8%, resultados próximos, mas dando vantagem para a reação de IFI. A percentagem de testes negativos foi de 32,3% para IFI e de 26,5% para o teste ELISA, os testes duvidosos foram 5,9% para IFI e 14,7% para ELISA. Quando os resultados dos pacientes do Serviço de Endoscopia Per Oral foram avaliados independentemente verificou-se 75,8% de positividade tanto para o teste ELISA como para IFI, 18,2% de negativos para ELISA e 24,2% de negativos para IFI e 6,06% de indeterminados por ELISA. Os pacientes encaminhados pelas Regionais de Saúde do interior do Estado onde foram encontrados triatomíneos em suas moradias deram como resultado 50% de IFI positivo. E os resultados de ELISA para esse grupo foram semelhantes ao IFI. No grupo de pacientes atendidos durante o surto agudo em Santa Catarina, os resultados de IFI foram mais determinantes, pois, classificaram a doença sob a forma aguda ou crônica. O teste ELISA foi negativo para os pacientes com títulos baixos de IgM (1/40 e 1/80) no teste de IFI. Este fato se deve a não existência no mercado de testes de ELISA que pesquisem os anticorpos da classe IgM, não podendo ser usado em suspeitas de doença aguda. Porém, quando os anticorpos de IgG no teste IFI se encontram acima de 1/40, normalmente o teste ELISA (IgG) também é positivo. Para o teste de ELISA, os resultados indeterminados foram maiores do que nos testes de IFI, isso pode ser explicado pelo fato do teste ELISA não ser quantitativo, mas qualitativo.

Segundo a Resolução número 153 da ANVISA, anexo VIII de 14/06/2004, os Bancos de Sangue são obrigados a fazer apenas um teste imunoenzimático com alta sensibilidade. Os testes imunoenzimáticos têm a vantagem de poderem ser feitos em grande escala e serem automatizados o que facilita para os bancos de sangue que tem muitas coletas por dia. A incubação, lavagem e leitura são feitas através de aparelhos facilitando a execução da técnica. Porém, não existe recomendação, tanto no Ministério da Saúde como na ANVISA, sobre as marcas de Kits que seriam confiáveis ou a uniformidade de metodologias para os diferentes kits, resultando exames divergentes entre os Bancos de Sangue no Brasil e os

Laboratórios de Referência de cada Estado, uma vez que, todos os testes duvidosos ou inconclusivos e positivos são encaminhados para os LACEN (Laboratórios de Referência Estaduais) para confirmarem estes resultados. Vale ressaltar que o custo por bolsa de sangue estimado é de U\$ 60,00 (CARVALHO *et al.*, 1993) e que um resultado inconclusivo leva a mesma a ser rejeitada e o paciente a uma peregrinação por diferentes serviços, sem contar o aspecto social.

Apesar disso, os métodos sorológicos atuais continuam sendo ótimas ferramentas no diagnóstico da doença de Chagas crônica devido a terem boa sensibilidade e especificidade, pois os níveis de anticorpos são demonstráveis décadas após a infecção (VATTUONE *et al.*, 1976; KIRCHHOFF *et al.*, 1993), salvo os casos de administração de drogas imunossupressoras onde os resultados não seriam os verdadeiros.

Os antígenos recombinantes de terceira geração de *T. cruzi* utilizados nos testes de ELISA melhoraram a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico laboratorial de doença de Chagas. Esse mercado melhorou muito depois que houve decisão governamental de testar todas as amostras de bancos de sangue para doença de Chagas e de outras enfermidades passíveis de contaminação por via sanguínea. Pressionadas pelos próprios bancos de sangue que queriam kits diagnósticos mais precisos e rápidos, as empresas de insumos biológicos e diagnósticos se especializaram e se empenharam na melhoria de seu produto para atrair o mercado muito vantajoso de hemobancos.

Ainda é necessária melhor vigilância por parte do governo para garantir a qualidade dos insumos oferecidos pelas diversas empresas para evitar que um kit sem garantias esteja sendo ofertado ao mercado oferecendo riscos principalmente ao receptor de bolsas de sangue.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, apresentaram alta sensibilidade concordando com os de Teixeira *et al.* (1994) que avaliaram diferentes testes sorológicos, encontrando 100% de sensibilidade para os testes ELISA (de duas marcas diferentes) e especificidade de 94% para pacientes crônicos de doença de Chagas, para IFI encontraram 100% de sensibilidade e 95% de especificidade. Porém ambos testes apresentaram reações cruzadas com leishmaniose visceral ou tegumentar. Schindler (1986) comparou seis reações sorológicas utilizando o teste IFI como referência e observou melhor correlação entre os testes de IFI e HAI

(Hemato-aglutinação) que apresentaram 100% e 97% de sensibilidade respectivamente. Desde a década de 70 os antígenos utilizados para a reação de ELISA para o diagnóstico da doença de Chagas foram sendo melhorados de modo que Ferreira *et al* (2001), encontraram 100% de sensibilidade e 98,9% de especificidade. Índices similares foram encontrados por outros autores consolidando a sorologia por ELISA como ótima ferramenta para avaliação sorológica de doadores de sangue para doença de Chagas em bancos de sangue (VERGARA *et al.*, 1992; PERALTA *et al.*, 1994; PARANHOS-BACALLA *et al.*, 1994; GODSEL *et al.*, 1995; KRAUTZ *et al.*, 1995, UMEZAWA *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2001).

Quanto à hemocultura não foi possível isolar o *T.cruzi* de muitos pacientes, pois a coleta se baseou em uma única amostra num volume final de 30 mL para todos os tipos de exames. Para o grupo de pacientes atendidos pelo Ambulatório de Doença de Chagas no Hospital de Clínicas de Curitiba, a percentagem de positividade foi de 7,7%(2/26). No Serviço de Endoscopia Per-Oral o nível de positividade foi de 3,7%(1/27). No surto de suspeita de doença aguda por via oral, apenas de um paciente atendido no LACEN-PR durante o surto foi possível isolar o parasito. Em todos os trabalhos avaliados sobre hemocultura a recomendação é que sejam feitas mais de uma coleta para tentativa de isolamento do *T. cruzi*, e no mínimo 30 mL de sangue em cada coleta (CHIARI, 1999). O objetivo seria aumentar a positividade da técnica em doença crônica cuja parasitemia é baixa (PORTELA-LINDOSO e SHIKANAI-YASUDA, 2003). Essa técnica continua sendo o padrão ouro segundo o Ministério da Saúde por evidenciar o parasito na amostra do paciente. Em termos de especificidade a técnica é excelente, mas um resultado negativo não pode ser interpretado como se o paciente estivesse livre da doença, pois o número baixo de parasitas circulantes na corrente sanguínea, na fase crônica, pode não ser suficiente para positivar a hemocultura (DIAS; MACEDO, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase já existe para detecção de uma série de enfermidades, como por exemplo, para AIDS, onde amostras de pacientes positivos são submetidas ao teste de quantificação viral. Também já vem se utilizando desta técnica e com sucesso para confirmação de diagnóstico de hepatite B e C.

Para preencher a lacuna deixada pela hemocultura na confirmação de doença de Chagas em pacientes suspeitos, a reação de PCR utilizando iniciadores específicos para *T. cruzi* tem demonstrado alta sensibilidade para o diagnóstico

(TAIBI *et al.*, 1995, KIRCHHOFF *et al.*, 1996, MARCON *et al.*, 2002, Ramirez *et al.*, 2002, BRAZ-ALMEIDA, 2006) o que torna uma técnica interessante para ser usada em rotina. Para introduzir esta metodologia primeiramente é necessário fazer a escolha e avaliar os iniciadores (*primers*). Os iniciadores denominados TCZ1 e TCZ2 amplificam uma seqüência repetitiva nuclear que está presente em mais ou menos 100.000 cópias por parasita (KIRCHHOFF *et al.*, 1996) e Moser *et al.* (1989) demonstraram a amplificação de metade do DNA de um único parasita utilizando esses iniciadores. Esses mesmos iniciadores foram utilizados por Portela-Lindoso e Shikanai-Yasuda (2003) que encontraram uma sensibilidade de 5 fg de *T. cruzi* o equivalente a 0,022 moléculas por parasito. Os autores também pesquisaram a seqüência S35 e S36 do cinetoplasto e concluíram que os iniciadores TCZ1 e TCZ2 foram mais sensíveis. Outros autores testaram no mesmo experimento diversos iniciadores para *T. cruzi* e obtiveram melhores resultados com os *iniciadores* TCZ1 e TCZ2 (DIAZ *et al.*, 1992). Marcon *et al.* (2002) padronizaram a técnica de PCR para pacientes chagásicos transplantados e adaptaram a Nested-PCR usando como primeira amplificação os iniciadores TCZ1 e TCZ2. Por todos esses fatores foram escolhidos os iniciadores da região nuclear repetitiva denominada TCZ1 e TCZ2 para ser padronizado a PCR, no presente trabalho. Também foram escolhidos iniciadores para detectar o *T. cruzi* da região do cinetoplasto, e revendo a bibliografia, optou-se por um iniciador que não demandasse muita manipulação para a extração de DNA, pois sabe-se que o DNA do cinetoplasto é super enovelado o que exige mais cuidado na extração para liberar o DNA. Assim, o escolhido foram os iniciadores Tc24-T1 e Tc24-T2 de acordo com TAIBI *et al.*, 1995, porque as seqüências de iniciadores de cinetoplastos S35 e S36, 121 e 122, CV1/Cv2 e TC1 e TC2 deram reações cruzadas com outros parasitos Kinetoplastidae tais como espécies *Leishmania* e *T. rangeli* (VIRREIRA *et al.*, 2003).

Para o *T. rangeli*, alguns autores verificaram que os iniciadores S35 e S36 poderiam ser usados para amplificar ambos os parasitas, *T. cruzi* com 330 pb e *T. rangeli* com 760 pb e um conjunto de fragmentos de 300-450 pb com ausência do fragmento de 330 pb, porém em camundongos infectados com ambos os parasitos, *T. rangeli* foi observado por PCR apenas durante a fase aguda (VALLEJO *et al.*, 1999). Vargas *et al.* (2000), relataram que a PCR baseada no k-DNA não permitiu o diagnóstico de infecção mista na maioria dos insetos infectados. Achados

confirmados por Ramirez *et al.* (2002), quando aplicaram a técnica em amostras de culturas de *T. cruzi* isoladas de gambás e triatomíneos. A região foi capaz de detectar um décimo do conteúdo de DNA de um único parasito, enquanto Sturm *et al.* (1989) e Avila *et al.* (1991) e revisto por Vargas *et al.* (2000) relatam que a análise permitiu a detecção da milésima parte de uma única célula de *T. cruzi*.

Vargas *et al.* (2000) experimentaram a sequência repetitiva P542 em culturas e trato digestivo de *Rhodnius prolixus* infectados com *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* e em conteúdo intestinal de *R. colombiensis* sp., cujos iniciadores se denominam R1 e R2 e encontraram que a sequência P542 está presente em aproximadamente 10^3 cópias por genoma do parasito. A técnica permitiu a detecção de um décimo do conteúdo de DNA de um único parasito. Os autores propõem que a discriminação e detecção sensível de *T. cruzi* e *T. rangeli* por PCR deveria empregar duas sequências específicas não relacionadas. Assim, no presente trabalho optou-se por utilizar os iniciadores de *T. cruzi* da região nuclear repetitiva TCZ1/TCZ2, da proteína flagelar de 24KDa de *T. cruzi* Tc24-T1 e Tc24-T2 e para *T. rangeli* os iniciadores R1 e R2.

Ao avaliar todas as amostras selecionadas, neste trabalho, verificou-se que a PCR utilizando os iniciadores TCZ1 e TCZ2 no grupo de pacientes positivos em pelo menos um teste sorológico e com epidemiologia para doença de Chagas foi de 95% (19/20) para os atendidos no Ambulatório de Doença de Chagas do Hospital de Clínicas de Curitiba e de 95,6% (22/23) para os pacientes do Serviço de Endoscopia Per-Oral. Um paciente do Ambulatório de Doença de Chagas e um paciente do Serviço de Endoscopia Per-Oral que possuíam epidemiologia e histórico familiar de doença de Chagas, além de sorologia altamente positiva não apresentaram exame de PCR positivo após várias repetições com a mesma amostra. Para o paciente do Serviço de Endoscopia Per-Oral isso ocorreu provavelmente por não ter sido encontrado o parasito em sua amostra de sangue, pois esse paciente relatou que tomou droga antiparasitária por ocasião do descobrimento de sua enfermidade. Três pacientes do Ambulatório de Doença de Chagas que apresentaram sorologia negativa e/ou indeterminada e epidemiologia positiva tiveram a PCR positiva. O paciente com megacólon chagásico do Hospital de Clínicas se confirmou a doença de Chagas por PCR, e os pacientes vindos das regiões do interior do Estado foram

positivos para PCR nos mesmos pacientes que possuíam sorologia reagente e epidemiologia sugestiva, ou seja, concordância de 100 % entre a sorologia e a PCR.

Os resultados mais interessantes foram realizados com pacientes agudos vindos de surto de doença de Chagas contaminados por via oral ocorrido no Estado de Santa Catarina, pois os pacientes com IFI positivo para IgM se confirmaram pela PCR, e os pacientes crônicos desse grupo de pacientes e que não sabiam que tinham a doença também tiveram o exame de PCR positivo.

O oligonucleotídeo iniciador TCZ1 e TCZ2 é extremamente repetitivo e ocorre em “tandem”, ou seja, todas em um mesmo cromossomo e contíguas. Esta característica faz com que exista a possibilidade do fenômeno do tipo “tudo ou nada”, quando apenas uma fração do DNA que foi extraído é analisada (BRAZ-ALMEIDA, 2006). Por este motivo todos os testes que deram reação negativa foram repetidos mais duas vezes com concentrações diferentes de DNA (2 µL, 4 µL e 8 µL), sendo que, 16 pacientes foram positivos na primeira vez com 2 µL, 13 pacientes foram positivos na segunda tentativa com 4 µL e 23 pacientes foram positivos com 8 µL de DNA extraído de seu sangue para *T. cruzi*.

Pelos resultados obtidos a PCR usando os iniciadores TCZ1 e TCZ2 foi capaz de amplificar DNA de apenas um parasito concordando com diversos autores que determinaram ser esse iniciador muito sensível (MOSER *et al.*, 1989, KIRCHHOFF *et al.*, 1996; PORTELA-LINDOSO, 1998; BRAZ ALMEIDA, 2006).

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi testada usando organismo da mesma família, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *T. rangeli*, porém os resultados deram positivos, ou seja, apresentou baixa especificidade. Este fato já havia sido observado por Portela-Lindoso (1998) que amplificou DNA de duas cepas de *T. rangeli*, além de *L. mexicana* e *L. chagasi*. Porém, outros autores não observaram amplificação de fragmento de DNA similares ao testarem *Leishmania* (MOSER *et al.*, 1989; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1996). O mesmo teste de especificidade foi empregado por Braz-Almeida, (2006) que não observou amplificação das amostras de DNA de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* na concentração de 1 µg. No entanto, amostras de DNA do *T. rangeli* da cepa *sangustini* foram amplificadas nas concentrações de 1 µg a 10 ng, o que não ocorreu em concentrações mais baixas de 1 ng até 10 pg.

De acordo com Moser *et al.* (1989), embora os minicírculos e o elemento de 195 pb (TCZ) constituam aproximadamente a mesma fração de DNA total do parasito, a seqüência do minicírculo de 1450 pb possui apenas 4 cópias da região altamente conservada. Há também outra desvantagem para a região do minicírculo de 120 pb – já que ele apresenta alguma similaridade com o minicírculo de outros tripanossomatídeos – é a reduzida especificidade na detecção (MOSER *et al.*, 1989). Além disso, os minicírculos estão firmemente super enovelados, o que torna necessária a clivagem com enzimas de restrição para maximizar o acesso dos iniciadores e da Taq-DNA polimerase às seqüências alvo (BRAZ-ALMEIDA, 2006). Portanto, os autores apontam o elemento repetitivo de 195 pb (TCZ) como uma seqüência-alvo ideal para amplificação do DNA do *T. cruzi* (MOSER *et al.*, 1989).

Brenière *et al.* (1995) e Dorn *et al.* (1997) utilizaram como alvo de amplificação o DNA mitocondrial do parasito, porém, o protocolo de extração de DNA mitocondrial, é mais complexo que o DNA nuclear, pois se encontra superenovelado como descrito anteriormente.

Portela-Lindoso (1998) também utilizou os iniciadores TCZ1 e TCZ2 e afirmou que esses iniciadores reconhecem fragmentos de DNA parasitário mais frequentemente entre os tripanossomatídeos quando comparados aos iniciadores S35 e S36, que amplificam seqüência repetitiva de 330 pb do DNA do cinetoplasto. Machado *et al.* (2000) utilizaram os iniciadores DIAZ-7 e DIAZ-8, que amplificam um fragmento de 195 pb, da seqüência nuclear repetitiva do TCZ.

No presente trabalho o uso do iniciador TCZ1/TCZ2 não permitiu a diferenciação das linhagens de *T. cruzi* existente no Estado do Paraná, pois segundo Thomaz-Soccol *et al.*, (2002) parasitos isolados de reservatório e vetores pertencem à linhagem I ou zimodema I e Kopp *et al.*, (2005) demonstraram que as cepas de *T. cruzi* isoladas de humanos pertencem ao zimodema II. No entanto, ao ser submetido aos diferentes iniciadores não foram diferenciadas as linhagens. Provavelmente o uso de enzimas de restrição poderia dar resposta a esta questão.

Virreira *et al.*, (2003), testaram vários iniciadores para PCR de *T. cruzi* e concluíram que os melhores foram TCZ1/TCZ2 e DIAZ1/DIAZ 2, ambos da região satélite repetitiva e tem 195 pb, mas o amplicon maior foi TCZ1 e TCZ2. Outros iniciadores testados pelos autores foram BP1/BP2, O1/O2, PON1/ PON2, Tca1/Tca2 e iniciadores da região do DNA cinetoplasto S35/S36 e 121/122, os quais variavam

em intensidade de amplicon de acordo com a linhagem de *T. cruzi* e o ensaio de PCR foi menos sensível.

Neste trabalho foi também testado o iniciador Tc24T1 e Tc24T2 que amplifica fragmentos de 550 pb. A PCR utilizando esses iniciadores permitiu a amplificação de DNA de uma das cepas de *L. braziliensis* e mostrou uma sensibilidade (89,3%) inferior a aquela com os iniciadores TCZ1 e TCZ2 (100% para culturas de *T. cruzi*). Virreira *et al.* (2003) ao compararem a capacidade de um grupo de *primers* em detectar linhagens diferentes de *T. cruzi* verificaram que o par TCZ1/TCZ2 amplificou todas as linhagens avaliadas e que outros amplificaram apenas algumas dessas linhagens. A não amplificação de três culturas utilizando Tc24T1/Tc24T2 sugere que esse par de iniciadores não amplifica todas as linhagens e por isso prejudicaria seu uso em diagnóstico. Outro problema observado é que o iniciador Tc24-T1/Tc24-T2 se mostrou excelente para análise em parasitos isolados em culturas, mas em DNA de *T. cruzi* extraído junto com sangue de pacientes o teste foi negativo, mas para o iniciador TCZ1/TCZ2, aliando sorologia positiva ou indeterminada com epidemiologia positiva a reação de PCR apresentou 96,4% de sensibilidade. Provavelmente exista algum componente no sangue que causa inibição da reação com iniciador Tc24-T1/Tc24-T2, ou talvez, a maneira de extrair o DNA tenha que ser diferente, ou mesmo a sensibilidade seja mais baixa em relação ao primeiro iniciador sendo mais viável sua eficácia na análise de *T. cruzi* isolados de cultura.

Visando verificar se pacientes com sorologia positiva ou indeterminada e PCR negativo para iniciadores de *T. cruzi* poderiam estar parasitados por *T. rangeli*, utilizou-se o iniciador R1/R2 que amplifica fragmento de 450 pb. Nenhum paciente ou cultura teve fragmento de DNA amplificado para este iniciador, o que indicaria que os pacientes indeterminados não estavam contaminados por *T. rangeli*.

Para pacientes transplantados ou fazendo uso de drogas imunossupressoras o teste de PCR para doença de Chagas se torna excelente ferramenta, uma vez que, os testes sorológicos falham pela quase ausência de anticorpos nesses casos específicos. Como o *T. cruzi* se aproveita da baixa imunidade do paciente para se manifestar, seria o diagnóstico laboratorial de escolha para detectar o parasito em circulação e tratar o paciente nesse momento.

Assim, estaríamos evitando re-invasões do parasito nos órgãos transplantados se for o coração e agudização da doença de Chagas.

Para o diagnóstico laboratorial de pacientes rejeitados em bancos de sangue por sorologia positiva para doença de Chagas, a PCR se torna excelente metodologia para dar um suporte aos LACENs responsáveis por esse diagnóstico, pois esses pacientes normalmente estão indeterminados ou são negativos para doença de Chagas e seria mais um teste de certeza para confirmar o diagnóstico para esse grupo de pessoas normalmente angustiadas em receber um resultado definitivo. O custo-benefício torna-se vantajoso.

7 CONCLUSÃO

- 1) A sorologia utilizando as técnicas de IFI e ELISA continua sendo ótima ferramenta na detecção de *T. cruzi*, tanto para pacientes com cardiopatia quanto para as formas digestivas.
- 2) A técnica de IFI para pesquisa de IgM permitiu diagnosticar casos agudos mostrando-se fundamental para diagnóstico em surtos de transmissão por via oral ou outras.
- 3) A hemocultura deve ser utilizada na pesquisa e para o isolamento do *T. cruzi*, pois permitirá conhecer a variabilidade genética do protozoário. Mas sua demora inviabiliza a aplicação prática pelos LACENS.
- 4) A PCR empregando o iniciador TCZ1/TCZ2 apresentou baixa especificidade, pois se observou a amplificação de DNA de *T. rangeli*, *L. amazonensis*, e de *L. braziliensis*.
- 5) A PCR utilizando os iniciadores R1/R2 permitiu a amplificação de *T. rangeli* e *L. amazonensis*, mas não permitiu a amplificação de *T. cruzi* e *L. braziliensis*.
- 6) A PCR com os iniciadores TCZ1/TCZ2 como também a PCR com R1/R2 permitiram a detecção de um único parasito.
- 7) Os iniciadores TCZ1/TCZ2 foram sensíveis (96,1%) e poderão ser facilmente utilizados no laboratório como diagnóstico de certeza aliados aos iniciadores R1/R2 de *T. rangeli* e à sorologia.
- 8) Nenhum paciente ou cultura isolada de triatomíneos, reservatórios ou pacientes teve reação positiva para *T. rangeli* por PCR.
- 9) A Reação em Cadeia da Polimerase é um teste muito útil para confirmar diagnóstico, especialmente nos casos de sorologia duvidosa de pacientes assintomáticos para confirmar ou excluir o diagnóstico.
- 10) A PCR é ferramenta importante para avaliar re-invasão de órgãos nos casos de transplante de órgãos, evitando assim, que novos focos da doença se estabeleçam no indivíduo.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 437-454, sep. 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Dados de bancos de sangue referentes aos anos de 2000, 2002, 2004**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 13 jun. 2005:
- AKHAVAN, D. **Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Nacional de Saúde, 1996.
- ALMEIDA, E. *et al.* Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 513-517, oct./dec. 1990.
- ALMEIDA, I. C. *et al.* A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, v. 37, n. 8, p. 850-857, aug. 1997.
- AMATO-NETO, V. *et al.* Observações sobre o TESA-blot no diagnóstico sorológico da doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 534-535, dez. 2005.
- AMATO-NETO, V.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; AMATO, V. S. Doença de Chagas Aguda. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 127-134, 1997.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. A doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach (estudo experimental em camundongos). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, n.5, p. 219-224, set./out. 1966.
- ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETO. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 231-245, 2000.
- ARAUJO, S. M. *et al.* Doença de Chagas em Crianças no Estado do Paraná – Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 3, p. 151-153, 2004.
- ARAUJO, S. M.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongo C3H isogênico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, v. 2, p. 175-181, abr./jun. 1988.
- BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Phylogenetic diversity of bat *trypanosomes* of subgenus *Schyzotrypanum* base on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide

sequence analyses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 3, p.201-208, feb. 2003.

BARNABÉ, C.; CASTRO, E.; LUZ, E.; TIBAYRENC, M.; SOCCOL, V. T. *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná State, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 81-86, feb. 2002.

BORGES-PEREIRA, J.; COURA, J. R. Diferenças regionais na doença de Chagas. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de duas áreas endêmicas do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n.2, p. 70-71, 1993.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 153, de 14 de junho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jun. 2004.

BRAZ-ALMEIDA, L. **Comparação da reação em cadeia da polimerase com o exame microscópico na detecção de *T. cruzi* em amostras do trato digestório do *T. infestans***. São Paulo, 2006. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J.C. P.; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: um manual prático para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 25-31, 1997.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Chagas' disease in Bolívia: clinical and epidemiological features and zymodema variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Northbrook, v. 41, n.5, p. 521-529, nov. 1989.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Copy number differences in the 195 pb repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potential use for epidemiologic surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 163-165, jan./mar. 1993.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Population genetics of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: taxonomical and epidemiological purpose. **Biological Research**, v.26, p. 27-33, 1993.

BRISSE, S. *et al.* Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* base on nucleotide sequences and molecular karyotype. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n.3, 173-183, feb. 2003.

BRISSE, S. **Philogénie moléculaire des clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, agente de la maladie de Chagas: évolution clonale, recombinaison génétique et relations phylogénétiques avec d'autres espèces du sous-genre *Schizotrypanum***. France : 1998. Doctorat Sciences: Université Montpellier II.

BRISSE, S., DUJARDIN, J. C. ; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 111, n. 1, 95-105, nov. 2000.

BRITTO, C. *et al.* A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n.1, p. 171-172, jan./mar. 1993.

BRITTO, C. *et al.* Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 823-826, aug. 2001.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, n. 5, p. 227-235, sep./oct. 1966.

CAMARGO, M. E.; AMATO-NETO, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 16, n. 4, p. 200-202, jul./aug. 1974.

CAMARGO, N. J. **Erradicação do *Triatoma infestans* nos municípios do Paraná, Brasil**. Curitiba: I Encontro Paranaense de Parasitologia, 2007.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p.29-37, jan./feb. 2002.

CANÇADO, J. R. Tratamento específico da doença de Chagas nas fases aguda e crônica. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.667-676.

CARCAVALLO, R. U.; GIRÓN, I. G.; JURBEG, J.; LENT, H. **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p. 1024.

CARLIER, Y. *et al.* Trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas. **Encyclopédie Médico-Chirurgicale**, v. 8, p. 505-520, 2002.

CARNEIRO, M. *et al.* Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. **Acta Tropica**, v. 47, n. 1, p. 35-45, 1990.

CARRASCO, H. J. *et al.* Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 418-424, apr. 1996.

CARVALHO, M. R. *et al.* Chagas disease diagnosis: evolution of several test in blood bank screening. **Transfusion**, v. 33, n. 10, p. 830-834, oct. 1993.

CASTRO, R.; KUSCHNIR, E.; SGAMMINI, H. Evaluación de la performance cardíaca y perfusión miocárdica con radiotrazadores en la cardiopatía chagásica crônica. **Revista de la Federación Argentina de Cardiología**, v. 17, p. 226-231, 1988.

CHAGAS-FILHO, C. Histórico sobre a doença de Chagas. In: CANÇADO, J. R. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968, p. 5-21.

CHIARI, E. Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 299-300, sep. 1999.

CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; LAGES-SILVA, E. Diagnóstico e caracterização de tripanossomas. In: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.603-620.

CHILLER, T. M.; SAMUDIO, M. A.; ZOULEK, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 6, p. 650-656, dec. 1990.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V.; ALBAJAR, P. V. Doença de Chagas na Amazônia brasileira. In: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.595-601.

COUTINHO, M. **O Nobel Perdido**. Disponível em: <<http://www.folha.com.br>>. Acesso em: 11 set. 2002.

COUTINHO, M.; FREIRE JR., O.; DIAS, J. C. P. The noble enigma: Chagas' nomination for the Nobel Prize. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 123-129, sep. 1999.

CREMA, C. *et al.* Correlação manométrico-radiológica e sua importância no tratamento cirúrgico do megaesôfago chagásico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36, n. 6, p. 665-669, nov./dez. 2003.

CUNHA, T. C. *et al.* Megaesôfago, megacólon e alterações eletrocardiográficas em candidatos a doadores de sangue com reações sorológicas positivas para doença de Chagas no município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Revista Goiana de Medicina**, v. 33, p. 17-24, 1987.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, n. 4, p. 513-515, out./dez. 1984.

DEGRAVE, W. *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.27, n. 1, p. 63-70, 1988.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, jan. 2003.

DIAS, J. C. P. **Carlos Chagas: Prêmio Nobel em 1921**. Confêrencia Nacional de Saúde. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/cns/documentos/chagas.htm>>. Acesso em: 14 out. 2002.

DIAS, J. C. P. Control of Chagas’ disease in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, n. 11, p. 336-344, 1987.

DIAS, J. C. P. **Doença de Chagas em Bambuí, Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico epidemiológico a partir da fase aguda, entre 1940 e 1982**. Belo Horizonte: 1982. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**, São Paulo: Atheneu, 1999, p. 81-111.

DIAS, J. C. P. e MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p. 557-593.

DIAS, J. C. P. *et al.* Esofagite chagásica na área endêmica de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, p. 46-54, 1983.

DIAS, J. C. P. Situación actual de la Enfermedad de Chagas en las Américas. In: MADOERY, R. J.; MADOERY, C.; CÂMERA, M. L. **Actualizaciones en la enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Congreso Nacional de Medicina, 1993.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. C. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997 p. 33-66.

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C.; General situation and perspectives of Chagas’ disease in Northeastern Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, suppl. 2, 13-34, 2000.

DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V.; GONZALES, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, 616-623, may. 1992.

DORN, P. L.; SELGEAN, S.; GUILLOT, M. Simplified method for preservation and polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p.253-255, mar./apr. 1997.

FERREIRA, A. W. *et al.* Aspectos de padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas. Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de

sangue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 2, p. 123-128, mar./abr. 1991.

FERREIRA, R. S. Tratamento cirúrgico do megaesôfago chagásico. In: CANÇADO, J. R. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968, p. 592-604.

FIFE Jr., E. H.; MUSHEL, L. H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 3, p. 540-543, jul. 1959.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos**. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/pub/gve/pdf/gve0507.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2002.

FURUCHO, C. R. **Diagnóstico de doença de Chagas em bancos de sangue: linfoproliferação, detecção de anticorpo e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas**. São Paulo: 2006. Dissertação de Mestrado: Universidade de São Paulo.

GALVÃO, L. M. C.; *et al.* Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 220-223, mar./apr. 1993.

GODSEL, L. M. *et al.* Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, 33, n. 8, p. 971-974, aug. 1995.

GOLDENBERG, S. *et al.* Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, suppl. 1, p. 39-44, 1984.

GRISARD, E.; STEINDEL, M; **Diagnóstico da doença de Chagas**. Disponível em <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br>>. Acesso em: 24 jul. 2002.

HAYES, R. J.; SCHOFIELD, C. J. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones y parasitas crônicas a partir de la prevalência: la enfermedad de Chagas em América Latina. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 108, n. 4, p. 308-316, apr. 1990.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparision of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas' disease in an endemic region of north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 129-132, mar./apr. 1996.

KIRCHHOFF, L. V. *et al.* Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1171-1175, may. 1996.

KIRCHHOFF, L. V.; American trypanosomiasis (Chagas'disease): a tropical disease now in the Unites States. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 9, p. 639-644, 1993.

KOEBERLE, F. Chagas' disease and Chagas syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. **Advances in Parasitology**, v. 6, p. 63-113, 1968.

KOEBERLE, F. Moléstia de Chagas: enfermidade do sistema nervoso. **Anais do Congresso Internacional de Doença de Chagas**, v.2, p. 691-716, 1961.

KOPP, R. L. **Variabilidade genética de *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) e sua implicação na epidemiologia de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 em dois focos no Estado do Paraná**. Curitiba: 2002. Tese de Doutorado: Universidade Federal do Paraná, p. 204.

KOPP, R. L; MIYAZAKI, M.; SOCCOL, V. T. *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909: genetic variability of isolates from chronic patients in the Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 389-395, may. 2005.

KRAUTZ, G. M.; GALVÃO, L. M.; CANÇADO, J. R. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 2086-2090, aug. 1995.

KRIEGER, M. A. *et al.* Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The Americam Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 4, p. 427-434, apr. 1992.

LEEDALE, G. F.; VICKERMON, K. Euglenozoa. In: **The Illustrated guide to the Protozoa**. 2. ed. Kansas: Society of Protozoologiste, 2000, p. 1135-1184.

LENT, H.; WIGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 163, n. 3, p. 128-250, 1979.

LOPES, E. R. *et al.* Prevalência de megas em necropsia realizadas no Triângulo Mineiro no período de 1954 a 1988. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 4, p. 211-215, out./dez. 1989.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Pathogenesis of American trypanosomiasis. In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P.H.; MILES, M. A. **The Trypanosomiasis**. London: CABI Publishing, 2004, 303-330.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; NETO, M. B. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000, p. 345-378.

MACEDO, A. M. *et al.* DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 55, n. 1-2, p. 147-153, oct. 1992.

MACEDO, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 1-12, feb. 2004.

MACEDO, A. M. *et al.* Usefulness of microsatellite typing in population genetic studies of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n. 3, p. 407-413, apr. 2001.

MACEDO, V. O. Forma Indeterminada da doença de Chagas. In: DIAS, J. C. P. e COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p. 135-152.

MACEDO, V. O. **Influência da exposição à reinfecção na evolução da doença de Chagas (estudo evolutivo de cinco anos)**. Rio de Janeiro: 1973. Tese de Livre-Docência: UFRJ, Faculdade de Medicina, 125 p.

MACHADO, E. M. M. *et al.* A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 6, p. 863-866, nov./dec. 2000.

MAEKELT, G. A. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 11-15, jan. 1964.

MALDONADO, C. *et al.* Using Polymerase Chain polymerase reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1345-1348, dec. 2004.

MARCON, G. E. B. *et al.* Use for a nested-polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, n. 1, p. 39-43, may. 2002.

MARQUEZ, E. *et al.* Clonal population structure of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 6, p. 1143-1149, dec. 1998.

MATIOLI, S. R.; BUENO, M. R. S. P. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S. R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MAURICE, J.; PEARCE, A. M. **Tropical disease research: a global partnership eighth programme report**. Geneva: World Health Organization, p. 89-98, 1987.

MILES, M. A. *et al.* The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.

MILES, M. A. The agent. In: GILLES, M. H. **Protozoal diseases**. London: Hodder Arnold, 1999, p. 313-323.

MILES, M. A.; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 2, n. 4, 1986.

MILES, M. A.; YEO, M.; GAUNT, M. W. Epidemiology of american trypanosomiasis In: MAUDLIN, I.; HOLMES, P. H.; ILES, M. A. **The Trypanosomiasis**. London: CABI Publishing, 2004, p. 243-251.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Coordenação de sangue e hemoderivados**. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Epidemiologia da doença de Chagas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Reunião sobre tratamento etiológico da doença de Chagas**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1996.

MONTANAT, E. E. *et al.* Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes correlation with clinical picture. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 6, p. 625-628, dec. 1996.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1477-1482, jul. 1989.

MUNIZ, J. Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e subagudas da doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 45, n. 3, p. 537-549, set. 1947.

NEAL, R. A.; MILES, M. A Indirect hemagglutination test for Chagas' disease with a simples method survey work. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 12, n. 5, p. 325-332, sep./oct. 1970.

NETO, R. B. **Uma pesquisa completa**. Disponível em: <<http://www.folha.com.br>>. Acesso em: 15 set. 2002.

NETO, S. W. **Risco residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil**. São Paulo: 2005. Tese de Doutorado: Universidade de São Paulo.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Iniciative del cono sur: estado actual de las acciones para la eliminación de la transmisión transfusional del *Trypanosoma cruzi***. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1992, p. 92-118.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Health conditions in the Americas. **Pan American Health Organization Scientific Publication**, v. 524, p. 160, 1990.

PARANHOS-BACALLA, G. S. *et al.* Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. **Parasite Immunology**, v. 16, n. 3, p. 165-169, 1994.

PERALTA, J. M. *et al.* Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 971-974, 1994.

PEREIRA, J. B. **Morbidade da doença de Chagas: estudos seccional e longitudinal em uma área endêmica – Virgem da Lapa – Minas Gerais**. Rio de Janeiro: 1983. Tese de doutorado: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 132 p.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Pessoa Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p. 125-182.

PORTAL DA SAÚDE. **Epidemiologia nos serviços: surto de doença de Chagas agudo (DCA) em Santarém/PA em junho de 2006**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=24541>. Acesso em: 3 fev. 2007.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B. **Reação da polimerase em cadeia na doença de Chagas crônica: emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de *Trypanosoma cruzi* de sangue e em outros tripanosomatídeos**. São Paulo: 1998. Tese de mestrado: Universidade de São Paulo.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B. Resumo de Tese. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.32, n. 5, p. 731-732, 1999.

PORTELA-LINDOSO, A. A. B.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Chronic Chagas' disease from xenodiagnosis and hemoculture to polymnerase chain reaction. **Rev. Saúde Pública**, v.37, n. 1, p. 107-115, feb. 2003.

PRATA, A. Classificação da infecção chagásica no homem. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 23, p. 109-113, 1990.

PRATA, A. Formas clínicas da doença de Chagas. In: CANÇADO, R. **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado, 1968, p. 344-358.

PRATA, A. **Reunião sobre diferenças regionais na doença de Chagas**. Distrito Federal: Universidade de Brasília, 1975.

RAMIREZ, L. E. *et al.* High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly – endemic área of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, n. 3, p. 189-198, dec. 2002.

RASSI JR. *et al.* Relação entre sintomas, disfunção ventricular na cardiopatia chagásica crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 59, supl. 2, p. 182, 1992.

RASSI, A. *et al.* Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 485-489, nov./dez. 2004.

REY, L. **Parasitologia Médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 27-49.

REZENDE, J. M. Forma digestiva da moléstia de Chagas. **Revista Goiana de Medicina**, v. 5, p. 193-227, 1959.

REZENDE, J. M. O aparelho digestivo na doença de Chagas: aspectos clínicos. In: DIAS, J. C. P. e COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p.153-176.

ROCHA, A. *et al.* Doença de Chagas: interação com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). In: BRENER, Z.; AMDRADE, Z.A.; NETO, M. B. **Trypanosoma cruzi e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 406-410.

ROMANHA, A. J. **Heterogenidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. Belo Horizonte: 1982. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Minas Gerais, 110 pp.

RUSSOMANDO, G. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: PCR based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 62-66, jun. 1996.

SALLES, N. A. *et al.* Risk of exposure to Chagas' disease among seroactive Brazilian blood donors. **Transfusion**, v. 36, n. 11-12, p. 969-973, nov./dec. 1996.

SALLES, N. A.; SABINO, E. C.; BARRETO, C. C. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-sangue/Hemocentro de São Paulo. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 13, n. 2-3, p. 111-116, fev./mar. 2003.

SAMBROOK, J.; FROTSCJ. E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Haror Laboratory Press, 1989.

SCHINDLER, L. A. Infección chagásica en donante de sangre de La Rioja. Comparación entre las seis reacciones serológicas utilizadas. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 20, n. 1, p. 39-47, 1986.

SCHOFIELD, C. J. **Triatominae: biologia y control**. London: Eurocommunica Publications, 1994.

SCHUMUNIS, G. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J. C. P; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p. 11-23.

SEGURA, E. L. In: MANSILHA, A. **La prevención sigue siendo el remedio mas efectivo contra el mal de Chagas**. Buenos Aires: La Nación, 1994, p. 10.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Use of PCR for detection of *Trypanosoma cruzi* in triatome vectors. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 649-651, nov./dec. 1996.

SICA, R. Compromiso del sistema nervioso. In: STORRINO, R.; MILEI, J. **Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Mosby, 1994, p. 303-320.

SILBER, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of *primers* (BP1/BP2) targeted it a nuclear DNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 225-232, mar. 1997.

SILVA, A. L. Formas digestivas: tratamento cirúrgico. In: DIAS, J. C. P. e COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997, p. 177-200.

SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, supl. 3, p. 11-22, 1994.

SILVEIRA, A. C.; VINHAES, M. C. Elimination of vector-borne transmission on Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 405-411, nov./dec. 1999.

SILVEIRA, A. C.; VINHAES, M. C. **Grupo de trabalho em doença de Chagas**. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2000.

SILVEIRA-LACERDA, E. P. *et al.* Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 3, p. 204-207, oct. 2004.

SIMÕES, A. J. P. Doença de Chagas no estado do Paraná, Brasil: esboço epidemiológico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 3, p. 279-290, dec. 1943.

SIQUEIRA-BATISTA, R. Patologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; NETO, M. B. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 79-90.

SMYTH, J. D. **Introduction to animal parasitology**. 3. ed. New York: Cambridge University Press, 1994.

SOCCOL, V. T. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná State, Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 81-86, feb. 2002.

SOUZA, L. C. G., Pesquisa inédita busca tratamento para doença de Chagas. **Revista Vida Universitária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, n. 173, p. 17, 2007.

STEINDEL, M. *et al.* Characterization of *Trypanosomes* from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (*Chiroptera: Vespertilionidae*), captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 3, p. 601-607, jun. 1998.

STEINDEL, M. *et al.* Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 261-267, may./jun. 1994.

STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. In: CARLI, G. A. **Parasitologia clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001.

STEVENS, J. R.; GODFREY, D. G. Numerical taxonomy of *Trypanozoon* based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. **Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 75-86, feb. 1992.

STURM, N. R. *et al.* Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 205-214, mar. 1989.

TAFURI, W. L.; BRENER, Z. Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da tripanosomíase *cruzi* experimental. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 9, n. 3, p. 149-154, may./jun. 1967.

TAIBI, A. *et al.* Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. **Parasitology**, v. 111, n. 5, p. 581-590, dec. 1995.

TEIXEIRA, M. G. M.; PEREIRA, J. B.; PERALTA, J. M. Avaliação de testes sorológicos aplicados para a detecção de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 30, n. 3, p. 133-139, 1994.

TIBAYRENC, M. *et al.* Natural populations of *Trypanosoma cruzi* the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115-119, jan. 1986.

TIBAYRENC, M. *et al.* The microdistribution of isoenzyme strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia. New isoenzyme profiles and further arguments against

mendelian sexuality. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 519-525, 1984.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution**, v. 42, n. 2, p. 277-292, mar. 1988.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p. 228-232, sep. 1991.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 7, p. 2414-2418, apr. 1990.

UMEZAWA, E. F. *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigen of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 2143-2147, sep. 2001.

UMEZAWA, E. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas' disease in Brazil (Catolé da Rocha, Paraíba). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 87-93, 1996.

UMEZAWA, E. S.; SILVEIRA, J. F. Serological diagnosis of Chagas' disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, suppl. 1, p. 285-288, 1999.

VALLEJO, G. A. *et al.* Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. **Acta Tropica**, v. 72, n. 2, p. 203-212, mar. 1999.

VARGAS, N. *et al.* Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 147-159, nov. 2000.

VATTUONE, N. H.; SZARFMAN, A.; GONZALES CAPPA, S. M. Antibody response and immunoglobulin levels in human with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infection. (Chagas' disease). **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 45-47, feb. 1976.

VAZ, M. G. M. *et al.* Correlação entre a sintomatologia e a evolução do megaeosôfago. **Revista Goiana de Medicina**, v. 41, p. 1-15, 1995.

VELASQUEZ, E. *et al.* Autoantibodies give false positive reactions in the serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 1, p. 35, jan./feb. 1993.

VERGARA, V. *et al.* Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 1, p. 39-43, jan. 1992.

VIOTTI, R. *et al.* Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and sorologic evolution of patients with long term follow up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151-162, jan. 1994.

VIRREIRA, M. *et al.* Comparação de métodos de PCR para detecção fácil e confiável de *Trypanosoma cruzi* infecção congênita. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 574-582, may. 2003.

WINCKER, P. *et al.* Use of a polymerase simplified chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 6, p. 771-777, dec. 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease: second report of the World Health Organization Expert Committee. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, v. 905, p. 109, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1	- PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS	100
ANEXO 2	- EXTRAÇÃO DE DNA	103
ANEXO 3	- FICHA EPIDEMIOLÓGICA	108
ANEXO 4	- TERMO DE CONSENTIMENTO.....	109

ANEXO 1 – PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS

PREPARAÇÃO DE PBS pH 7,2 PARA IMUNOFLORESCÊNCIA (IFI)

Cloreto de Sódio PA..... 8,77g
 Fosfato de Sódio Dibásico anidro..... 1,02 g
 Fosfato de Sódio Monobásico anidro 0,34 g
 Água destilada qsp..... 1.000 mL
 Acertar o pH para 7,2.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO GLICERINA TAMPONADA pH 9,6 PARA IFI

Solução 1:

Bicarbonato de Sódio 4,2 g
 Água destilada qsp..... 100 mL

Solução 2:

Carbonato de Sódio 5,3 g
 Água destilada qsp..... 100 mL

Misturar 13 mL da solução 1 com 10 mL da solução 2, retirar 10 mL dessa mistura e acrescentar 90 mL de glicerina P.A., acertar o pH para 9,6. Guardar em geladeira.

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE AZUL DE EVANS PARA DILUIR O CONJUGADO DE IFI

Sal de azul de Evans..... 10 mg
 PBS pH 7,2..... 100 mL

Esta é a solução estoque.

1. Retirar 10 mL da solução estoque de azul de Evans e juntar com 90 mL de PBS.
2. Desprezar 2 mL dessa solução e acrescenta 2 mL de Tween 80 P.A., deixar escorrer espontaneamente sem encostar a pipeta na solução do frasco.
3. Levar ao banho-maria à 37°C até que o Tween 80 tenha diluído completamente na solução.
4. Guardar em frasco âmbar em geladeira.

REAGENTES PARA TÉCNICA DE ELISA VEM JUNTO COM O KIT CHAGATEK® DA BIOMÉRIEUX.

Consultar a bula do kit para diluição do conjugado e do tampão de lavagem que mudam de acordo com o número de “tiras” que serão utilizadas.

MEIOS DE CULTURA PARA *Trypanosoma cruzi*

Meio de TOBBIE e EVANS para cultura em tubos

Agar.....	10 g
Peptona.....	1 g
Extrato de carne	1,5 g
Cloreto de Sódio.....	4 g
Água destilada qsp.....	500 mL

Distribuir em tubos e juntar 10% de sangue de coelho citratado.

Citrato: 4 mL para 60 mL de sangue (15%).

Meio: Tubo pequeno colocar 2,0 mL de meio e 0,2 mL de sangue (10%).

Tubo grande colocar 3,0 mL de meio e 0,3 mL de sangue.

Meio de LIT

Finalidade: obtenção de biomassa para a extração do DNA do protozoário.

Cloreto de Sódio.....	5,0 g
Fosfato de Sódio monobásico anidro	7,5 g
Tryptose	5,0 g
Yeast Extract	3,0 g
Liver infusion	3,0 g
Cloreto de Sódio.....	0,4 g
Água destilada qsp.....	1000 mL

1. Ajustar o pH para 7,4 com o Fosfato de Sódio dibásico 1 M.

2. Autoclavar por 30 minutos a 120 ° C.

3. Juntar 2,0 mL de Hemina.

*Garrafa pequena = 10 mL de LIT + 1,0 mL de soro fetal bovino + 1,0 mL do inóculo.

*Garrafa grande = 60 mL de LIT + 6,0 mL de soro fetal bovino + 6,0 mL do inóculo.

4. Manter em cultura na garrafa pequena por 7 dias, após passar para a garrafa grande e deixar por mais 7 dias.

Hemina

Hemina 0,5g

Hidróxido de Sódio 10 mL

Água destilada qsp..... 90 mL

1. Dissolver a Hemina no Hidróxido de Sódio 1N e completar o volume para 100 mL com a água destilada.

2. Autoclavar a 120° C. por 15 minutos.

*Modo de usar: adicionar 1,0 mL desta solução em 100 mL de meio e conservar a 4°C.

ANEXO 2 – EXTRAÇÃO DE DNA

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CULTURAS DE *T. cruzi*.

1. Passar o meio de *T. cruzi* da garrafa para tubos de Falcon estéreis.
2. Centrifugar à 12000 x g por 10 minutos a 4°C.
3. Descartar o sobrenadante.
4. Lavar com soro fisiológico estéril até ficar límpido com a mesma rotação, tempo e temperatura acima.
5. Passar para tubo de criobiologia estéril, centrifugar 10 minutos à 4°C na velocidade de 12000 x g.
6. Colocar 500 µL de tampão de lise, ressuspender no Vortex.
7. Congelar a -196° por 5 minutos e descongelar em banho maria a 37°C. Repetir esse processo por 3 vezes.
8. Adicionar 5 µL de lisozima (100 mg/mL), solução recente. Incubar a 37°C por 60 minutos.
9. Adicionar 50 µL de SDS a 5%. Homogeinizar.
10. Adicionar 2,5 µL (20 mg/mL) de Proteinase K. Homogeinizar e incubar a 55°C por 30 minutos.
11. Congelar e descongelar como anteriormente descrito.
12. Para desnaturar a Proteinase K aquecer a 95°C por 10 minutos.
13. Centrifugar a 750 x g por 5 minutos.
14. Transferir o sobrenadante para novos tubos estéreis.
15. Adicionar 5 µL de RNase (20 mg/mL).
16. Incubar a 37°C por 30 minutos.
17. Extrair DNA com volume a volume de uma solução fenol. Recuperar o sobrenadante. Transferir o sobrenadante para um novo tubo a cada lavagem. Lavar 3 vezes a 5 vezes até retirar toda a proteína. Para recuperar o sobrenadante usar pipetas com as pontas cortadas e estéreis. Centrifugar cada etapa a 14000 x g por 5 minutos.
18. Fazer uma extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1).
19. Centrifugar a 14000 x g por 5 minutos. Recolher o sobrenadante.

20. Finalmente fazer uma extração com clorofórmio (vol/vol), após centrifugação (14000 x g / 5 minutos) recuperar o sobrenadante.
21. Adicionar 1/10 volume 3M de acetato de sódio pH 6,0. Adicionar em seguida 2 volumes de etanol absoluto gelado.
22. Centrifugar por 30 minutos a 14000 x g a 4°C.
23. Lavar 2 vezes o sedimento com etanol 70% gelado por 5 minutos a 4°C,
24. Desprezar o sobrenadante e deixar secar bem o sedimento na estufa a 37°C.
25. Reconstituir o DNA com 100 µL de água ultrapura e estéril.
26. Guardar congelado a -20 ° C até o momento do uso.

PREPARAÇÃO DO MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100pb. (Invitrogen)

20 µL de bromofenol.

10 µL de marcador 100 pb

70 µL de T.E.

Usar 2,5 µL desta solução a cada corrida no gel de eletroforese.

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO TEN PARA DILUIR LISOZIMA.

Tris 10 mM

EDTA..... 10 mM

NaCl1 50 mM

1. Dissolver o Tris em água destilada.
2. Corrigir o pH para 8,0 com HCl concentrado.
3. Colocar o EDTA e homogeneizar em agitador magnético.
4. Acrescentar NaCl.
5. Acrescentar água ultra pura para 198 mL e corrigir o pH para 8,0 com NaOH.
6. Completar o volume para 200 mL.
7. Autoclavar e conservar em geladeira.

LISOZIMA (100 mg/ml)

Lisozima pó 0,100 g

Tampão TEN 1 mL

Guardar em tubos de criobiologia estéreis fracionando em 20 µL em cada frasco e guardar em freezer a -20°C.

SOLUÇÃO PARA DILUIÇÃO DE PROTEINASE K

1. Dissolva em Tris-EDTA 10 mM pH 7,5, Cloreto de cálcio 20 mM e glicerol 50%.
2. Alternativamente, dissolva 50 mM Tris-HCl pH 8,0, acetato de sódio 1 a 5 mM.
Guarde a 4°C.

Obs. Estocar à – 20° C sem o glicerol pode ocorrer precipitação da Proteinase K. Crescimento bacteriano pode ocorrer em solução guardada à 4°C por um longo período.

PROTEINASE K

1. Colocar 5 mL de solução de diluição de Proteinase K pH 7,5 filtrada (tubo de Falcon) no frasco contendo 100 mg da enzima pó.
2. Acondicionar 20 µL da solução preparado em frascos de criobiologia estéreis e guardar em freezer a – 20°C.

SOLUÇÃO DE AZUL DE BROMOFENOL

Preparar uma solução a 40 % de sucrose (8 g de sacarose em 20 mL de água ultrapura) e adicionar 0,05g de azul de bromofenol. Colocar em agitador magnético por 20 minutos em papel alumínio em volta do frasco.

TAMPÃO T.E.

Tris-HCl 10 mM

EDTA.....0,1 mM

1. Prepara-se Tris-HCl 1 M (24,23 g em 200 mL de água ultrapura), ajusta-se o pH para 8,0.
2. Prepara-se o EDTA 0,5 M (37,22 g em 200 mL de água ultrapura), ajusta-se o pH para 8,0.
3. Pega-se 1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0 + 200 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e coloca-se em 98,8 mL de água ultrapura.
4. Autoclavar e guardar em geladeira.

SOLUÇÃO DE SDS 10%

SDS (Sulfato de dodecil sódio) PM 238,38 10 g

Água ultrapura..... 100 mL

Guardar em temperatura ambiente.

TAMPÃO DE LISE (100 ml)

Tris-HCl 1 M pH 8,0.....	1 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
SDS 10%5 mL	
Água ultrapura.....	74 mL

GEL DE AGAROSE A 1,6%

Agarose para Biologia Molecular.....	0,48 g
Tampão TAE ou TE qsp.....	30 mL.

Levar ao forno microondas por 1 minuto até completa dissolução, esperar esfriar e verter na cuba de eletroforese ele ainda morno. Cuidar para não formar bolhas.

DILUIÇÃO DO CORANTE DE DNA BROMETO DE ETÍDIO

Brometo de etídio	100 mg
Água ultrapura qsp	10 mL.

A solução foi agitada por várias horas e posteriormente estocada a 4°C. No momento do uso, 5 µL desta solução foram adicionados a 100 mL de tampão TBE 1x.

TAMPÃO TBE (10X CONCENTRADO)

Trisma-base	108 g
Ácido bórico.....	55 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água ultrapura.....	1000 mL
Autoclavar e guardar a 4°C.	

SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO 3 M pH 5,5

Acetato de sódio tri-hidratado.....	40,8 g
Água ultrapura qsp	90 mL

Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético glacial, ajustar o volume final para 100 mL.

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS PELO MÉTODO DE BOOM

1. Retirar os tubos contendo 0,9 mL de tampão de Lise da geladeira.
2. Agitar em Vortex até completa dissolução dos cristais de Tiocianato de Guanidina.
3. Colocar 0,01 mL de *buff-coat* no tubo com tampão de Lise, agitar e colocar 24 horas a 4°C.

*Importante: as amostras com tampão de Lise não podem ser colocadas a -20° C.

*Sílica: a sílica vem pronta para uso, mas deve ser levada ao Vórtex para homogeneizar a cada 3 amostras.

*Cuidados: Tampão de lavagem. Colocar no banho-maria (37°C) até dissolver os cristais. Em seguida agitar no Vortex para completa dissolução dos cristais.

*Etanol a 70% - preparar com água ultrapura solução recente.

4. Centrifugar os tubos contendo tampão de lise e amostra já deixados 24 horas em geladeira para abaixar o sobrenadante. 1 minuto a 12000 x g. Adicionar 50 µL de sílica em cada tubo. Agitar no Vórtex a cada 2 minutos por 10 minutos.
 5. Centrifugar 3 minutos e depois desprezar o sobrenadante sem tocar na sílica.
 6. Adicionar 1 mL de tampão de lavagem, agitar no Vortex até dissolução completa da sílica com o tampão de lavagem. Centrifugar por 1 minuto a 10000 x g. Repetir o desprezo do sobrenadante e repetir a etapa do tampão de lavagem.
 7. Adicionar 1 mL de etanol a 70%, agitar no Vórtex até completa dissolução da sílica no álcool. Centrifugar 1 minuto a 10000 x g. Repetir esse processo.
 8. Adicionar 1 mL de acetona PA, agitar no Vortex até completa dissolução da sílica na acetona. Centrifugar 3 minutos 10000 x g.
 9. Desprezar o sobrenadante e colocar o tubo aberto no termobloco a 56°C por 13 minutos. Colocar 100 µL de tampão de eluição do kit, após agitar no vórtex e colocar o tubo com a tampa fechada no termobloco a 56°C por 10 minutos agitando a cada 5 minutos.
 10. Centrifugar 5 minutos a 10000 x g.
 11. Levar o tubo a -20°C para procedimentos de PCR.
- *Cada vez que for utilizar descongelar o tubo, agitar no Vórtex e centrifugar 5 minutos por 10 000 x g.

ANEXO 3 – FICHA EPIDEMIOLÓGICA

INQUÉRITO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇA DE CHAGAS

DADOS PESSOAIS DO PESQUISADO			
Nome completo:		Data de nascimento: --/--/----	Idade: Sexo: F M
Endereço:			Nº
Bairro:	CEP:	Telefone:	Cidade/Estado:
Cidade em que nasceu?		Cidades onde morou?	
Obs.:			

Alguém de sua família já teve Doença de Chagas?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Se sim, qual é o grau de parentesco?		

Tem ou já teve bicho barbeiro em sua casa?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Se sim, há quanto tempo?	Meses:	Anos:

Há quanto tempo você sabe que tem Doença de Chagas?	Meses:	Anos:
Quais os medicamentos que você já tomou, ou está tomando?		
Quais os exames que você fez para comprovar sua doença?		

Você tem algum sintoma?	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Se sim, quais sintomas?		

Data: --/--/----	Assinatura do responsável pelas informações (paciente):
---------------------	---

EXAMES QUE O LACEN-PR REALIZARÁ:	
IFI:	Biologia molecular:
ELISA:	PCR:
Cultura:	RAPD:

Aviso importante: os dados contidos neste questionário serão divulgados apenas para fins de pesquisa científica; mas serão ocultados os dados pessoais do paciente para preservar a sua identidade.

ANEXO 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Padronização de métodos moleculares (PCR, RAPD) no diagnóstico e controle de *Trypanosoma cruzi* em comparação com métodos tradicionais.

Investigador: SORAIA REDA GILBER

Orientador: VANETE THOMAZ SOCCOL

Médica Responsável pelo ambulatório de doença de Chagas: MARCIA IURICO MIYAZAKI

Médico Responsável pelo Serviço de Endoscopia Per Oral: Dr. ANTONIO ULISSES GAVAZZONI

Local da Pesquisa: AMBULATÓRIO DE DOENÇA DE CHAGAS E SERVIÇO DE ENDOSCOPIA PER ORAL – HOSPITAL DE CLÍNICAS

Endereço: RUA GENERAL CARNEIRO, 180. CURITIBA – PARANÁ

PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é provocada pela picada de um inseto (bicho barbeiro) contaminado por um parasita chamado *T. cruzi*. Quando esse parasita entra na corrente sanguínea, ele sofre várias mudanças e depois atinge um órgão, de preferência o coração ou o tubo digestivo, provocando uma doença grave com aumento desses órgãos, problemas cardíacos graves ou congestionamento do tubo digestivo (megacolon), causando muito mal-estar ao paciente e fraqueza.

Na fase aguda da doença, existe tratamento à base de parasiticidas específicos, mas na fase crônica, o tratamento consiste em aliviar os sintomas e evitar novas reinfestações (de outros órgãos), assim, é possível aumentar a sobrevivência do paciente. Para o diagnóstico da doença o médico lança mão de exames laboratoriais de sorologia e radiografias dos órgãos envolvidos. Na fase aguda é importante o exame

parasitológico para pesquisa do parasita no sangue através da gota espessa ou cultura do parasita

PROPÓSITO DO ESTUDO

Com esse estudo pretende-se validar as técnicas de Biologia Molecular para o diagnóstico laboratorial de doença de Chagas, e acompanhar o paciente chagásico crônico como exame para controle do tratamento.

As técnicas de Biologia Molecular serão duas (PCR e RAPD), ambas irão pesquisar o DNA do parasita para verificar a eficácia do tratamento e confirmação da doença em casos de pacientes que procuram o serviço pela primeira vez para saber se estão com a doença (pacientes diagnosticados no Biobanco).

SELEÇÃO

Para ser incluído na pesquisa, você precisa estar sendo acompanhado pelo ambulatório de doença de Chagas do Hospital de Clínicas de Curitiba, cuja responsável é a Dra. Márcia Iurico Miyazaki, ou ser acompanhado pelo Serviço de Endoscopia Per Oral, e concordar com a coleta de sangue que será realizada pela pesquisadora Soraia Reda Gilber. Na ocasião da coleta, serão feitas algumas perguntas sobre o tempo que você tem essa doença, seus sintomas, que medicamentos você toma, onde você contraiu, seu nome, endereço, e outras perguntas relacionadas à epidemiologia dessa enfermidade.

PROCEDIMENTOS

Será coletado cerca de 15 a 20 ml de sangue de seu braço, este material será encaminhado ao Laboratório Central do Estado (LACEN), com sede à rua Sebastiana Santana Fraga, 1001, Bairro Guatupê em São José dos Pinhais, na seção de Imunologia para proceder quatro tipos de exames diferentes: Imunofluorescência indireta, ELISA, Hemocultura e Biologia Molecular. Os resultados serão encaminhados ao ambulatório de doença de Chagas, através da Dra. Márcia que entregará aos pacientes, ou ao Serviço de Endoscopia per oral sob a responsabilidade do Dr. Antonio Ulisses.

Alguns exames como os sorológicos são mais rápidos e poderão estar disponíveis aos pacientes em uma semana. Outros porém, como a hemocultura pode demorar até três meses, porém todos serão encaminhados ao Hospital de Clínicas para que sejam arquivados nos prontuários dos pacientes e, para que os mesmos recebam todo o acompanhamento necessário pela Dra. Márcia que é a médica responsável pelo serviço do ambulatório de doença de Chagas, ou para o Dr Antonio Ulisses do Serviço de endoscopia per oral.

Na ocasião da coleta, o paciente poderá sentir a dor da picada da agulha, que é passageira, e alguns pacientes poderão manifestar um hematoma (manchas roxas) no local da punção. Isto é perfeitamente normal e poderá ser solucionado com compressas de gelo no local. Caso o hematoma persista favor entrar em contato com o ambulatório de doença de Chagas pelo telefone 3360-7853. Caso você tenha alguma dúvida quanto aos seus exames você pode contatar com o LACEN, através

do telefone 3299-3264, com a farmacêutica-bioquímica Soraia Reda Gilber, responsável pelo diagnóstico da doença de Chagas no LACEN.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

CUSTOS

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS

O investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você, relativas ao período de tempo de sua doença, cidades onde já morou, se mais alguém da família já teve doença de Chagas, sintomas e demais perguntas relacionadas à epidemiologia do bicho barbeiro. Todos estes dados serão mantidos de forma confidencial, e seu nome será substituído por um número de registro ou código para assegurar sua identidade. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

CONTATO PARA PERGUNTAS

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o investigador do estudo (fone 3299-3264), ou sua equipe (Dra. Márcia 3360-7853). Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

ASSINATURA

DATA

